

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DANIŞMAN: Yard.Doç.Dr.Vecdet ÖZ**

**VISSERAL LEISHMANIASIS TANISINDA KARŞILAŞILAN
SORUNLAR**

(DOKTORA TEZİ)

Hüseyin ÇAKAN

İSTANBUL, 2006

TEŞEKKÜR

Beni araştırmaya yönlendiren, teşvik eden çok kıymetli hocam Prof.Dr. Sevil Atasoy'a,

Değerli katkılarını esirgemeyen çok kıymetli hocam Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof.Dr.İmdat Elmas'a,

Destek ve yardımlarını benden esirgemeyen sabır ve nezaketiyle beni yönlendiren değerli hocam sayın Prof.Dr. H.Bülent Üner'e,

Çalışmalarım sırasında bana gösterdiği hoşgörü, ilgi ve desteklerinden dolayı Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Salih Cengiz'e,

Araştırma ve çalışmaya her zaman açık olan sayın hocam Prof.Dr.Sermet Koç'a,

Kişiliği ve mesleki deneyimi ile bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden fazlasıyla yararlandığım tez danışmanım sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Vecdet Öz'e,

Her zaman ilgi ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Prof.Dr.Bekir Kocazeybek ve Prof.Dr.Fatih Yavuz'a,

Laboratuar çalışmalarım esnasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm bilgi ve becerilerini benimle paylaşan Yrd.Doç.Dr.Erdal Polat'a,

Dr.Mustafa Aslan'a Almanya Berlin Charite Robert Koch Mikrobiyoloji ve Hijyen Enstitüsü Moleküler Parazitoloji Bölüm sorumlusu Dr.Gabriella Schoinan'a ve E.Ü.Tıp Fakültesi Parazitoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Yusuf Özbek'e,

Çalışmalarım sırasında değerli katkılarını esirgemeyen Fizikçi.T.Mehmet Karayel ve Dr.Tunç Demircan'a,

Manevi desteklerini her daim benden esirgemeyen Adli Tıp Enstitüsü'nün çok değerli çalışan tüm mesai arkadaşlarım ve hocalarıma,

Her konuda olduğu gibi bana sabırla destek olan ve ilgilerini esirgemeyen aileme, eşim ve kızlarıma sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Hüseyin ÇAKAN

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Leishmania	3
2.1.1. Tarihçe.....	4
2.1.2. Etiyoloji	7
2.1.3. Yaşam Döngüsü	8
2.2. Leishmaniasis Klinik Şekilleri	9
2.2.1. Kutanöz Leishmaniasis.....	9
2.2.2. Visseral Leishmaniasis	9
2.2.3. Epidemiyoloji	10
2.2.4. Patogenez ve Patoloji	13
2.2.5. Visseral Leishmaniasis ve HIV	15
2.2.6. İmmünite.....	15
2.2.7. Vektörler	16
2.2.8. Rezervuarlar	18
2.2.9. Tanı ve Ayrıcı Tanı	19
2.2.10. Tedavi.....	20
2.2.11. Prognoz.....	21
2.2.12. Korunma ve Kontrol.....	22
2.3. Leishmaniasis'in Laboratuvar Tanısı.....	22
2.3.1. Etkensel Tanı	22
2.3.1.1. Direkt	23

2.3.1.2. Kültür.....	23
2.3.2. İndirekt yöntemler.....	23
2.3.3. Serolojik Tanı	25
2.3.3.1. İndirekt Floresans Antikor Testi	25
2.3.3.2. ELISA.....	25
2.3.3.3. Western Blot	26
2.3.3.4. Direkt Aglütinasyon Testi	27
2.3.3.5. İndirekt Hemaglütinasyon Testi.....	27
2.3.4. Leishmaniasis Tanısında Moleküler Yöntemler.....	27
2.3.4.1. Moleküler Tanı PCR.....	28
2.3.4.2. Nükleik Asit Saptama Yöntemleri	29
2.3.4.3. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri.....	30
2.4. Tıbbi Kusur.....	31
2.4.1. Tanıda Karşılaşılan Sorunlar	37
2.4.2. Tedavide Karşılaşılan Sorunlar.....	38
2.4.3. Tıbbi Uygulama Hataları ve Bilirkişilik.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Materyal.....	44
3.1.1. Çalışma Alanı	44
3.1.2. Hasta grupları.....	44
3.1.3. Materyal alma	44
3.1.4. Laboratuar Çalışmaları	44
3.2. Tanı ve Ayırım Yöntemleri	45
3.2.1. Direkt ve Kültür	45
3.2.2. Serolojik testler (ELISA, IFAT , Formol-Jel)	47
3.2.3. PCR... ..	50

3.2.3.1. Klinik Örneklerden DNA Ekstraksiyonu	50
3.2.3.2. PCR Amplifikasyon	51
3.2.3.3. Agaroz Jel Hazırlama ve Elektroforez	54
3.2.3.4. PCR Tanısında Kullanılan Kontrol Panelleri	55
3.2.3.5 .Nesdet- PCR	56
3.2.3.6. Restriksiyon Analiz	57
3.3. Kullanılan Malzeme ve Araç Gereçler	58
3.3.1. Kimyasallar ve Kitler	58
3.3. 2. Cihazlar.....	61
3.3.3. Standart solüsyonlar	62
4. BULGULAR	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	78
6. ÖZET	90
7. SUMMARY	92
8. KAYNAKLAR	94
9. EKLER.....	105
10. ÖZGEÇMİŞ.....	107

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Leishmaniasis; zorunlu hücre içi paraziti olan leishmania ile enfekte dişi tatarcık sineklerinin (Phlebotomus) kan emerken bulaştırdıkları memelilerin bir hastalık grubudur. Leishmaniasis zoonotik bir enfeksiyon olup, köpek ve diğer kemiricilerde de hastalık yapar (1). İlk defa 1900 yılında Leishman tarafından bir hastanın dalağında ponksiyon yapılarak gösterilmiştir (2). Leishmaniasis'in iki klinik şekli vardır. İç organlar leishmaniasis ya da kala-azar (visseral leishmaniasis) diğeri ise deriye yerleşen deri leishmaniasis ya da şark çıbanıdır (1,2). Visseral leishmaniasis (VL) retiküloendotelyal sistem, dalak, karaciğer, kemik iliği, lenf bezleri ve makrofajlara yerleşir. Sıklıkla çocuklarda nadir olarak da erişkinlerde hastalık yapar (1-3).

Visseral leishmaniasis yurdumuzda çoğunlukla kıyı bölgelerinde İzmir, Aydın, Denizli, Manisa, Muğla, Kastamonu, İstanbul, Bilecik, Karabük'ün yanı sıra Kars, Erzurum, Tokat, Konya, Niğde, Aksaray gibi farklı coğrafi bölgelerde bulunan illerde de bildirimlerin olması bu hastalığın ülkemizin her bölgesinde görülebileceğini düşündürmektedir (4 - 9). Visseral leishmaniasis kötü hijyen şartları yaşayan düşük sosyo-ekonomik durumda olanlarda daha da sık rastlanılır. Beslenme bozuklukları, vücut direncinin düşük olması da hastalığın oluşmasında önemli rol oynar (4). Sağlık bakanlığı verilerine göre yıllık ortalama 40 vaka bildirilmektedir (5). Tüm dünyada toplam 12 milyon leishmaniasis olgusunun bulunduğu, her yıl 200 000 kişinin VL nedeni ile öldüğü bildirilmektedir (10).

VL ön tanısı klinik bulgulara dayanılarak konabilir. Ancak kesin tanı hastadan alınan muayene maddesinden hazırlanan yayma preparatlarda leishmania'nın amastigot şekillerinin görülmesi, N.N.N.(Novy-MacNeal Nicolle) besiyeri kültüründe promastigot şekillerin üremesi, ayrıca serolojik olarak da ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), IFAT (İndirekt Immun Floresans Antikor Testi) ve Formol-Jel gibi yöntemlerle konur. Son yıllarda nükleik aside dayalı PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemlerinin

kullanılmasıyla leishmaniasis tanısında serolojik yöntemlere göre daha duyarlı ve özgül sonuçlar alınmaktadır (11-15). Muayene maddesi olarak dalak ponksiyon sıvısı ve kemik iliği en iyi materyalidir (16). Leishmaniasis paraziter hastalıklar içerisinde gerek tanı ve tedavisinin gerekse de kontrolünün zor olması nedeniyle önemli bir toplumsal hastalıktır. Bu nedenle leishmaniasis'le mücadele edebilmede ilk şart bu hastalığı iyi takip edebilmek, tanı ve tedaviyi de ona göre değerlendirmek esastır (17). Bildirimi zorunlu bulaşıcı hastalıklar listesinde yer alan leishmaniasis hekim standart vaka tanımına göre hastaya tanı koyabileceği ölçüde bildirimini yapar (18). Yapılan çalışmalarda geç tanı konup mortalite ile sonuçlanan olgular olduğu gibi, erken tanı konup tedavi edilen olgulara ait bildirimlerde bulunmaktadır (19). VL çoğu kez benzer klinik özelliklerden dolayı sıtma, tüberküloz, salmonella, akdeniz ateşi, febril nötrofeni vb. gibi hastalıklarla da karıştırılabilir (20). Enfeksiyon hastalığı olan leishmaniasis'in çok eskilere dayanan bir geçmişi olmasına rağmen, bu hastalıkla ilk karşılaşıldığında akla getirilmemesi temel tanı sorunlarından biridir. Çalışmamızın amacı Visseral Leishmaniasis şüpheli hastaların kemik iliği ve kan örneklerini PCR yönünden araştırarak, uygulanan Giemsa, kültür ve diğer serolojik yöntem sonuçlarıyla karşılaştırmaktır. Ayrıca hastaların klinik dosyalarından laboratuarmıza müracaat edene kadar hastalığı ile ilgili tanı ve hukuksal yönden karşılaştığı sorunların neler olduğunu belirleyerek, konunun toplumsal ve adli bilimler açısından önemini vurgulamak da amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Leishmania

Zorunlu hücre içi paraziti olan Leishmania, trypanozom ailesinin kinetoplastida sınıfına ait kan kamçılılarından. Leishmaniasis'i; enfekte dişi tatarcık sinekleri kan emerken bulaştırırlar (2,21,22). Zoonotik bir enfeksiyon olan leishmania, köpek ve diğer kemiricilerde hastalık yapar. Hastalığın klinik seyri, parazitin bulaşması, tropizmi ve patogenezi ile konağın immun sistemi arasındaki kompleks etkileşimlere bağlıdır. Klinik belirtileri; asemptomatik şekilden visseral leishmaniasis gibi ağır tablolarla seyreden değişik şekillerde olabilir (1). Leishmania türleri evrimlerini omurgalı ve omurgasız olmak üzere iki konakta geçirirler. Omurgalı konak insan veya diğer memeliler, omurgasız konak ise tatarcıklardır. Omurgalılarda leishmania amastigot formunda, omurgasızlarda ise promastigot şeklinde bulunurlar. Amastigot şekli yuvarlak veya oval biçimde büyükçe bir nükleusu ve küçük bir kinetoplastı olup hareketsizdir. Promastigot şekli ise mekik veya iğ biçiminde kamçılı ve hareketlidir. Leishmania'nın bilinen en az 30 türü vardır. Bunların 12 türü insanları enfekte eder (23). Yurdumuzda, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major* türleri ile enfeksiyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Bunlardan ilk iki tür insanlarda retiküloendotelial sistem hücrelerine yerleşerek iç organ leishmaniasis (visseral leishmaniasis)' ine neden olurlar. *L. tropica* ve *L. major* türleri ise deriye yerleşerek deri leishmaniosis(cutaneous leishmaniasis)'ine sebep olurlar (20,24).

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Teşkilatı Tropikal Hastalıkları Araştırma Merkezi'nin önemli kabul ettiği 6 hastalıktan birisidir. Bu hastalıkta; Visseral Leishmaniasis (VL), Cutaneous Leishmaniasis (CL) ve Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL) olmak üzere 3 farklı klinik tablo ortaya çıkmaktadır (24,25,26,27). Ayrıca son zamanlarda bunlara Diffüz Cutaneous Leishmaniasis (DCL) eklenmiştir. Akdeniz bölgesinde de geniş bir yayılım gösteren leishmaniasis, eko-epidemiolojik açıdan Antroponotik Cutaneous Leishmaniasis (ACL),

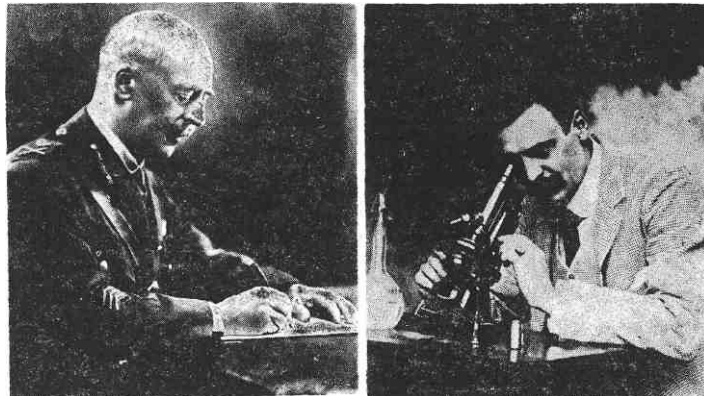
Zoonotik Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) ve Zoonotik Visseral Leishmaniasis (ZVL) olarak ayrılabilir (1,3).

WHO tarafından 1994 yılında AIDS sıklığındaki artışa paralel olarak VL olgularında da artış olduğu bildirilmiştir (1, 28, 29).

Leishmaniasis'in halk sağlığı üzerindeki etkileri uzun yıllar göz ardı edilmiştir. Son 10 yılda hastalığın yayılışına paralel olarak olgu sayısında da bir artışın olduğu görülmektedir. Dünyada 12 milyon kişinin leishmaniasis ile enfekte olduğu ve her yıl bunlara 2 milyon yeni olgunun (1.5 milyon CL, 500.000 VL) eklendiği tahmin edilmektedir (28). VL; sıklıkla *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* ve daha az olarak da *L. tropica*, *L. amazonensis* tarafından oluşturulmaktadır. Leishmaniasis; tedavi ve kontrolünde yaşanan zorluklar nedeniyle, paraziter hastalıklar içinde sıttadan sonra ikincil önemli hastalık olarak anılmaktadır (26).

2. 1. 1. Tarihçe

Bir enfeksiyon hastalığı olan leishmaniasis çok eski tarihlerden beri bilinmektedir. Hastalık iç organlar leishmaniasis, deri ve mukokutanöz leishmaniasis olarak gruplandırmıştır. İç organlar leishmaniasis ya da kala-azar olarak adlandırılan hastalığın etkeni; ilk kez 1900 yılında Hindistan'da hasta bir kişinin dalak yayma preparatında Leishman tarafından görülmüştür. Aynı yıl Donovan, farklı olgularda etkeni ortaya koymuş ve bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır (Resim 1).



Resim 1: Visseral Leishmaniasis'i ilk tanımlayan araştırmacılar

Etken Ross tarafından *Leishmania donovani* olarak adlandırılmıştır. Nicolle ve Compte 1908 yılında köpekte buldukları hastalık etkenini *Leishmania infantum* olarak adlandırmışlardır (2). Dünyada bu hastalığın tanınmaya başladığı tarih olarak 1835 kabul edilmesine rağmen visseral leishmaniasis'in batı dünyasında 19' uncu yüz yılın ikinci yarısında tanınmaya başladığı kabul edilir. Bununla beraber Kalkuta'da Avrupa Genel Hastanesinde çalışan Twining 1835 de «Bataklıklardan çıkan kokulara maruz tropikal memleketlerin endemik kaşeksisi» adını verdiği bir hastalığı tarif etmiştir. Hastalığın klinik tablosunun sporodik kala-azar olduğuna 1908'de Rogers dikkati çekmiştir. Yunanlılar 1836'da Spete adasında Klados ve Phonatos taraflarında bu hastalığın tarif edildiğini iddia ederler. İngilizler 1869'da Assam'ı işgal ettikleri zaman Garus bölgesi yerlilerin de görülen kala-azar (karahumma) hastalığının varlığını iyice öğrenmişlerdir. 1882'de Clarke bu hastalığın Hindistan'da bazı yerlerde hemen hemen hiç insan bırakmayacak kadar ölümlere sebep olduğunu bildirmiştir. Leishman 1900'de Hindistan'da Kalkuta yakınında Dumdum'da dizanteriye yakalanarak İngiltere'ye gönderilen ve 7 ay sonra ölen bir askerin dalağından yapılan yayma preparasyonlarda ufak oval cisimler görmüş ve bunları 1903'de yayımlamıştır. Leishman bunların tripanozomların yozlaşmış şekilleri olabileceğini sanmıştır. Laveran ve Mesnil bunların tripanozoma olmadığını dikkate alarak yaymaları incelenmesi için göndermiştir. Bunlar bu paraziti piroplasma olarak tanımlamışlar, aynı yıl Ross bu parazitler için leishmania cinsini tarif etmiş ve kala-azar etkenine *Leishmania donovani* adını vermiştir. Leishmania ve Donovan'da ayrı olarak, Leipzig'de F.Marchand Çin'den gelen bir kala-azarlı hastanın otopsisinde hücreler içinde bazı cisimler görmüş ve proyozone olabileceğini düşünmüşlerdir (2).

Kalkuta'da G. C. Chatterjee ve Rogers yaptıkları kültürde parazitin promastigot şekiller oluşturduğunu bulmuşlardır. Bu bulguyu Rogers 1904'de yayınlamıştır. S. R. Cristophers 1904'de kala-azarın patolojisini tarif etmiş ve parazitin dalak, karaciğer ve kemik iliğinde

hemen hemen aynı yoğunlukta bulunduğunu göstermiştir. Catoire 1904'de, Pianese 1905'de Akdeniz bölgesinde dalak anemisine yakalanan çocuklarda etkeni bulmuşlardır. Ch.Nicolle 1908'de daha önce Bezankon ve Griffon tarafından tarif edilen besiyerini basitleştirerek, Ch.Nicolle, Novy ve W.J.Mac Neal (N.N.N.)'in 1904'de tarif ettikleri besiyerine benzer bir besiyerinde paraziti üretmiş, köpeğe ve maymunlara aşlamış ve Akdeniz alt bölgesinde iç organlar leishmaniasis'inin rezervuarının köpek olacağı hipotezini ileri sürmüştür. Tunus'da 1908'de Nicolle ve Compte köpekte leishmania bulmuşlardır. Bu parazite 1908'de Ch.Nicolle *Leishmania infantum* adını vermiştir. Manson 1910 yılında kala-azarın antimonlu ilaçlarla tedavisini tavsiye etmiştir. Hans Schmidt beş değerli antimon bileşiklerini sentez etmiş, 1916'da İtalya'da Caronia tarafından denenmiştir. Brachmari 1922'de kala-azar sonrası deri leishmaniasis'ini tarif etmiştir. Napier 1922'de kala-azar tanısında formol-jel reaksiyonunun önemini vurgulamıştır. I. Kassiovski 1929 da kala-azar tanımında sternum delinmesi yöntemini önermiştir. Knowles, Napier ve Smith 1924 yılında kala-azar etkeninin *Phlebotomus argentipes*'in orta barsağında promastigot şekiline geçtiğini bulmuşlardır. H. E. Shortt, Barrand ve A. C. Craighead 1926'da tatarcıklarda parazitlerin sindirim yolunun ön kısmında biriktiğini saptamışlardır. R. Ü. A. Smith, Hadder ve I. Ahmed 1941'de tatarcıklardaki yaşam döngüsünü ortaya koymuşlardır. Hindistan'da Swaminath, Shortt ve Anderson 1942'de kala-azarlı hastaların üzerinde beslenen *Phlebotomus argentipes* ile beş gönüllüyü sokturarak bu enfeksiyonun bu şekilde bulaştığını kesin olarak ispat etmişlerdir.

Chopra 1927'de kala-azar tanımında antimon deneyini önermiştir. Yine Schmidt 1927'de hazırladığı neostibosan Napier tarafından 1927'de kala-azar tedavisinde kullanılmıştır. Sodium stibogluconate da Schmidt tarafından hazırlandıktan sonra hamster leishmaniasis'inde Kikuth ve Schmidt tarafından 1937'de başarıyla kullanılmıştır. Bunun Solustibosan adı ile hazırlanan özel eriyiği ile Napier, Chaudhuri ve Rai Chaudhuri 1937 de

Hindistan'da 10 hastayı tedavi etmişler ve iyi sonuç almışlardır. Adams ve Yorke 1939'da İngiltere'de, Adler ve Rachmilewitz Filistin'de 4,4-diamidino-stilbene'i kala-azar tedavisinde kullanmışlardır. R. Sohier, J. Pellerat ve G.V. Girard 1946'da glucantime ile kala-azarlı bir çocuğu iyileştirmişlerdir. Yurdumuzda ise leishmaniasis ile ilgili ilk bilgiler; Dr. Vefik Vassaf'a göre kala-azarın varlığını ilk yazan Kristamonas'tır. Bu hekim Trabzon'da kala-azar tesbit ettiğini bildirmiştir. General Ord. Prof. Dr. Abdülkadir Noyan 1916 yılında dalak ve karaciğer ponksiyonu yaptıkları hastaların 11'inde *Leishmania donovani* tesbit etmiştir. Dr. Hafert Kaller 1918 yılında İzmir civarından kala-azar'a rastladığını bildirmiştir. İbrahim Osman 1931 yılında bir kala-azar vak'ası yayınlamıştır. Dr. Akil Muhtar Özden 1936 yılında bir kaç kala-azar olgusu bildirmiştir (2, 21).

2. 1. 2. Etyoloji

Leishmania türlerinin yaşam döngüsünde, amastigot ve promastigot olmak üzere iki şekil bulunmaktadır. Amastigotlar 2-5 μ m boyunda yuvarlak veya oval şekildedir. Monositler, polimorf çekirdekli lökositler ve endotel hücrelerinde kümeler halinde, bu hücrelerin parçalanmasıyla tek tek dağılmış şekilde bulunurlar. Wright veya Giemsa ile boyanmış preparasyonlarda; sitoplazma mavi, nukleus ve nukleusa çok yakın kinetoplast parlak kırmızı renkte görülür. Parazit makrofajlarda parazitoforus vakuölü içindedir. *Leishmania*'ların amastigot şekilleri elektron mikroskobu incelemesinde; nukleus, nukleus içinde nukleolus, parabazal cisim, blefaroblasttan çıkan kamçı (rizoblast), sitoplazma da mitokondri, lizozom ve golgi aygıtı da görülür.

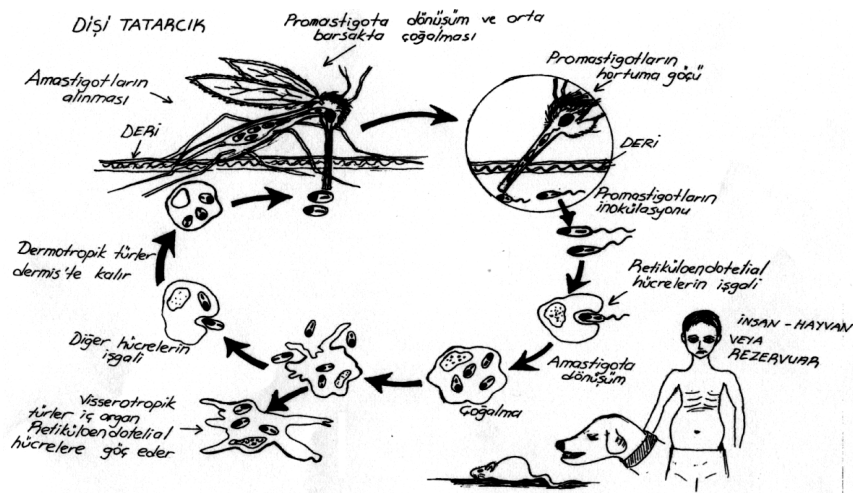
Promastigot 22-25°C'de N.N.N. besiyerinde ve phlebotomus'un barsaklarında görülen şekildir. Mekik şeklinde bir ucu künt 15-20 μ m uzunlukta 1.5-3.5 μ m genişlikte ve 15-28 μ m uzunlukta künt uçtan çıkan serbest bir kamçısı vardır. Wright veya Giemsa ile boyalı preparasyonlarda; sitoplazma ve kamçı mavi, nukleus ve kinetoplast parlak kırmızı rekte görülürler. Promastigotun elektron mikroskobik yapısı; ortada 0.6-1 μ m çapında nukleus,

nukleus içinde nukleolus, parabazal cisim, blefaroblasttan oluşan kinetoblastik kitle, blefaroblasttan çıkan fibriler yapı gösteren kamçı, sitoplazmada endoplazmik retikulum, golgi aygıtı gibi yapılardan oluşur (21,30).

2. 1. 3.Yaşam Döngüsü

Leishmania türlerinin yaşam döngüsünde, omurgalı ve omurgasız olmak üzere iki tür konak vardır. Omurgalı konaklar; insan, köpek, köpekgiller ve daha önemsiz olarak kemiricilerdir. Omurgasız konaklar; tatarcıklar, Yeni Dünyada Lutzomyia genusunda ve nadiren Psychodoygus'lardır (21, 31).

Enfekte kişilerden kan emen dişi tatarcıklar kanla birlikte leishmania'nın amastigot şekillerini de alırlar. Bu amastigot formlar orta barsakta promastigot şekline dönüşür. Peritrofik membran içinde gelişen promastigotlar çoğalarak peritrofik membranın ön kısmının erimesiyle torasik mideye geçerler. Özel bir tropizm ve kemotaksis ile göç ederek özofagus ve farinkse tutunurlar. Özofagustan ayrılarak ağız parçalarına gelir ve 4-7. günde hortumda görülürler. Tatarcıklar kan emmek için memeli derisini sokunca salyası ile promastigotları içeri verir.Kısa sürede makrofajlar tarafından fagosite edilen promastigotlar parazitoforus vakuolünde amastigot şekle dönüşür ve burada çoğalırlar. Amastigotlar makrofajda çoğalıp, hücreleri parçalar ve yeni hücreleri enfekte ederler (Şekil 1) (32).



Şekil 1 : Leishmania'nın yaşam döngüsü

2. 2. Leishmaniasis Klinik Şekilleri

Leishmaniasis; leishmania türlerinin memelilerde oluşturduğu, dünyada yaygın olarak görülen bir protozoon enfeksiyonudur. Ülkemizde, insanlarda CL ve VL olmak üzere iki şekilde görülmektedir (2, 21).

2. 2. 1. Kutanöz Leishmaniasis

Kutanöz leishmaniasis; *Leishmania donovani* dışındaki leishmania türleri ile oluşan, deride papül, nodül ve yara gibi belirtilerle kendini gösteren bir hastalıktır. Bu hastalık ülkemizde şark çıbanı, Antep çıbanı ve yıl çıbanı gibi isimlerle anılır. Genellikle deride skar şeklinde iz bırakarak iyileşirler (33). Tropik ve subtropik ülkelerde sık görülen Cutaneous leishmaniasis'in etkeni *Leishmania tropica*'dır. Ülkemizde, başta Şanlı Urfa olmak üzere Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu illerinde endemik veya epidemik olarak görülmektedir (2, 21, 22).

2. 2. 2. Visseral Leishmaniasis

Kala-Azar olarak da bilinen bu hastalığın doğadaki rezervuarı Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de köpeklerdir. VL'in etkeni *Leishmania infantum* olup inkübasyon süresi 2-8 ay arasında değişmektedir. Ülkemizde bu hastalığın; klinik seyri, patogenezi, laboratuvar tanısı, tedavisi ve hastalıktan korunulması için birçok araştırma yapılmıştır. Özellikle immun yetmezliği bulunan kişilerde güncel bir konu haline geldiği için çeşitli sağlık kuruluşları bu konuya ayrı bir önem vermektedir. Diğer fırsatçı patojen mikroorganizmalarda olduğu gibi, fırsatçı parazitlerin neden olduğu hastalıklar genellikle bilinen bulgular dışında ve ağır bir tablo ile seyretmektedir. Konağın immun direncinin çeşitli sebeplerle azalması veya baskılanması nedeni ile VL'de tonsiller, larinks, özofagus ve barsak gibi organlar da tutulabilmektedir (32,33). Erişkinlerde de görülen VL genellikle çocuklarda uzamış ve devam eden ateş, kilo kaybı, kansızlık, dalak ve karaciğer büyümesi, pansitopeni

vb. gibi klinik belirtiler gösteren tedavi edilmez ise ciddi enfeksiyonlara ve ölümlere neden olan bir hastalıktır (34).

Ülkemizde daha çok Ege ve Akdeniz Bölgelerinde görülen VL'e diğer bölgelerimizde de sporadik olarak rastlanmaktadır (6, 35).

2. 2. 3. Epidemiyoloji

Dünyanın birçok yerine yayılmış olan VL'e; *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* ve *Leishmania chagasi* neden olmaktadır. Tropikal ve subtropikal bölgelerin hastalığı olan leishmaniasis; Kuzey Afrika ve Güney Batı Asya'da özellikle 1-4 yaş, Batı Afrika ve Hindistan'da 5-9 yaş arası çocuklarda, Çin ve Avrupa'da ise hemen tüm yaş gruplarında görülebilecek şekilde epidemik karakter göstermektedir. Akdeniz havzası ve Avrupa için de bir sağlık problemi olan hastalık, Türkiye'den Portekiz'e kadar olan Avrupa kıyı bölgelerinde görülmektedir. Azerbaycan, Ermenistan, Türkmenistan, Kazakistan gibi ülkelerden de olgular bildirilmiştir. VL'in bölgesel olarak saptanmış tipleri arasında; Akdeniz, Hindistan, Çin, Sudan ve Güney Amerika tipleri bilinmektedir (23, 28).

Güney Avrupa'da HIV sıklığına paralel olarak VL sıklığında bir artışın olduğu belirtilmektedir. HIV+VL hastalarda ortalama yaşam süresi 13 ay olduğu bildirilmesine rağmen, sadece HIV'li hastalarda yaşam süresi daha uzundur (33). *Leishmania*'ların sınıflandırılması; oluşturdukları hastalıklar, coğrafik dağılım, epidemiyoloji ve etkenin özelliklerine göre yapılmıştır. Son yıllarda ise izoenzim analizleri ve monoklonal antikorlar kullanılarak kesin tür ayırımına gidilmektedir (1, 20, 22).

Birçok ülkede endemik olan leishmaniasis zaman zaman epidemilere neden olabilir. Hastalığın rastlandığı ülkelerde bölgesel karakter gösterir. Bunda ısı, nem, bölgenin yüksekliği ve bitki örtüsü gibi faktörlere bağlı olarak vektör olan tatarcık türlerinin o bölgede fazlasıyla çoğalabilmesi ve rezervuar olan insan ve hayvanların bulunması rol oynar. Bu yüzden kala-azar nehir vadilerinde, denizden yüksekliği 600-700 m'yi geçmeyen

alüvyonlu ovalarda daha sık görülür. Fakat Orta Asya'da olduğu gibi denizden 2000 m yüksek yerlerde de kala-azar görülür. Köylerde şehirlerdekinden çok daha sıktır. VL kötü hijyen şartlarında yaşayan düşük sosyo - ekonomik durumda olanlarda daha sık rastlanır. Tatarcıklar genellikle, binaların alt katlarına girer ve tek katlı, barınaksız meskenlerde yaşayanları daha çok sokarlar. Çok defa bir evde birden fazla enfeksiyona rastlanır. Beslenme bozuklukları, vücut direncinin düşük olması da hastalığın meydana çıkmasında önemlidir. Hastalığa duyarlılıkta ırkın ve cinsiyetin rolü yoktur. Tatarcık sokması olasılığı daha fazla olduğundan erkeklerde kala-azar daha fazla görülür (2, 21, 36).

1993 yılından beri leishmaniasis'in yayıldığı coğrafi alanlar önemli derecede artmıştır. Malnutrisyonun VL oluşmasında risk faktörü olduğu bilinmektedir ve dünyada ekonomik kriz, savaş, büyük göçler gibi durumların ortaya çıktığı bölgelerde epidemilere neden olmuştur. 1984-94 yılları arasında Sudan'da ortaya çıkan epidemi, bölgedeki ilk epidemi olması ve insanların duyarlılığının yüksek olmasının da etkisiyle bölgedeki 300.000 kişiden 100.000'inin ölümüne yol açmıştır. 1997'de yine Sudan'da hastalık oranında % 400 artış olmuştur. Bölgedeki kriz ve açlık nedeniyle oluşan büyük göçler ve mevsimlik işçi hareketleri epidemiyi Eritre ve Etyopya'ya da taşımıştır. Brezilya'da 1998 yılından beri VL olguları artmaktadır. Bu ülkede kırsal alanda 10 yıllık periyotlarda tekrarlayan VL epidemisi, ekonomik kriz ve göçler nedeniyle kentlere de taşınmıştır (28).

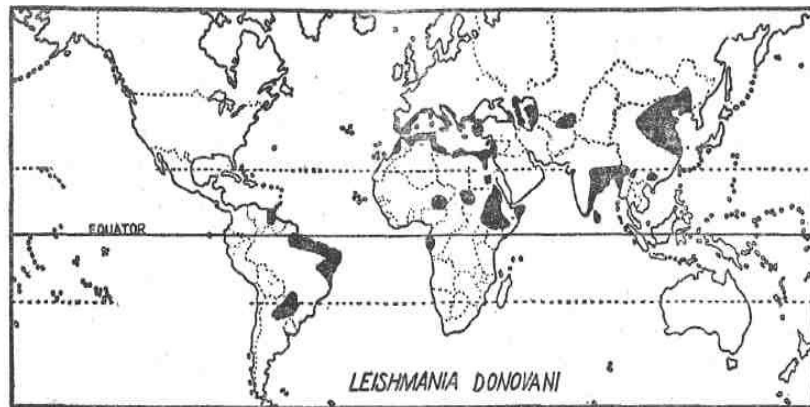
Dünya'da leishmaniasis; orman ürünleri ticareti, madencilik, baraj yapımı, tarım alanlarının genişletilmesi, yol inşaatları gibi nedenlerle orman alanlarının tahribi ve insanların bu bölgelerde yoğunlaşması, kırsal alandan kentlere göç, hızlı şehirleşme gibi durumlar, insanların flebotomlarla karşılaşmasını ve hastalığa yakalanmasını arttırmaktadır. 1996'da Afganistan'ın Kabil kentinde 270 000 deri leishmaniasis'inin olduğu hesaplanmıştır. Bu dönemde Kabil çok sayıda göç almış bir şehirdir ve nüfus hızla artarak 2 milyona ulaşmıştır. Hastalığın kentte bu şekilde artması da bu göçe bağlanmıştır. Bir diğer risk faktörü de

duyarlı kişilerin endemik bölgelere göç etmesidir. Bu durum, hastalığın görüldüğü yerlere ters göçe neden olan, büyük baraj inşaatları, çok sayıda kişiye iş ve yerleşme şansı veren tarımsal projeler sırasında görülür. Ülkemizde paraziter enfeksiyonların geleceği konusunda uygun önlemler alınmazsa her zaman bir risk faktörü olacaktır (2, 21, 37).

Türkiye'de VL çoğunlukla kıyı bölgelerimizde görülür. Fakat İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgemiz de sporadik olarak rastlanmaktadır (Şekil 2,3) (5, 35).



Şekil 2: Visceral Leishmaniasis'in Türkiye'deki yayılışı.



Şekil 3: Visceral Leishmaniasis'in Dünya'daki Dağılımı

2. 2. 4. Patogenez ve Patoloji

Tatarcıkların sokmasıyla deriden giren leishmania'nın promastigot şekilleri makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra amastigot formuna dönüşürler (38). Bu olay plazma hücreleri ile mononükleer hücreler arasında bir seri reaksiyon başlatır. Önce küçük bir granüloma oluşur. Başlangıçta görülmemekle birlikte, zamanla bu granüloma küçük bir papül şeklinde ortaya çıkabilir. Nadir de olsa bazı hastalarda geniş ülseratif lezyonlar oluşabilir. Burada haftalar veya aylarca sessiz kalabilirler. Zaman içinde kan akımına karışan makrofajlar beraberlerinde bu amastigotları da çeşitli dokulara taşırlar. Dalak, karaciğer, kemik iliği, lenf nodları, intestinal lenfatik dokular, submukoza ve diğer retiküloendotelial sistem organları ilk önce tutulan organlar arasında yer almaktadırlar (21).

Patolojik ilk bulgu, dalak ve karaciğerde mononükleer fagositlerin sayıca artmasına bağlı olarak bu iki organda progresif hipertrofinin meydana gelmesidir. Dalak aşırı genişler, splenik lenfoid foliküllerin yerini parazitle dolu mononükleer hücreler alır. Karaciğer Kupffer hücrelerinin büyüklüğünde ve sayısında önemli bir artış olur. Bu hücrelerin çoğu leishmania'nın amastigot şekilleri ile doludur ve karaciğer büyür. Dalaktaki hipertrofiye bağlı olarak hipersplenizm oluşur. Eritrosit, granülosit ve trombositlerin kısa sürede yıkılması sonucu oluşan anemiye lenfopeni eklenir. Kemik iliği makrofajlarla dolduğundan normalden fazla kan yapar ve böylece normoblast ile megaloblast arasında eritroblastlar oluşur. Bu durum sekonder enfeksiyonlara zemin hazırlar. İnce barsakta peyer plaklarının etrafındaki submukozanın amastigot şekilleri ile istila edilmesi sonucu hastalarda malabsorbsiyon ve albumin kaybı oluşur. Kalpte ve miyokard da dejeneratif bazı bozukluklar meydana gelir. Bu değişikliklerin yanında, otopsi bulgusu olarak aşırı derecede kaşeksi, deri ve mukozalarda solukluk görülür. Karında bombeleşme, el, ayak sırtlarında ve

karın derisinde belirgin bir koyulaşma vardır. Böylece «siyah hastalık» anlamında, kala-azar tablosu oluşur.

Retiküloendotelyal sistem'deki yoğun istila sonucunda immunoglobulin G (IgG) fazla sentez edilir. Ancak fazla sentez edilen poliklonal antikorların koruyucu etkisi olmadığı ve hemen hepsinin otoantikor yapısında olduğu tespit edilmiştir. Enfekte olmuş mononükleer fagositler kemik iliği, lenf nodları, deri ve diğer bölgelerde de görülmektedir. Plazma hücreleri ile mononükleer hücreler gecikmiş tip aşırı duyarlılığın ortaya çıkmasından sonra enfeksiyonu eradike edebilirler. Amastigotlar, deriden eradike edildikleri zaman leishmania türlerinin homolog cinsleri ile re-enfeksiyona karşı tam bir immünite oluşur. VL'e karşı direnç, hücresel immuniteye bağlı olarak gelişir. Hücresel cevap yeterli olduğunda karaciğerde sadece kendiliğinden iyileşen tuberkuloid bir granuloma oluşur. Eğer cevap yetersiz ise, optimal tedaviye rağmen % 5 ile 7 oranında ölüm olur (21).

İnsanların *L. donovani*'ye karşı dirençleri farklılıklar göstermektedir. Normal insanların serumunda etkeni eritici maddelerin varlığı gösterilmiştir. Leishmania'ları eriten maddeler yeni doğan bebeklerde vardır, daha sonra azalır, 6 yaşından sonra yeniden artar. İnsan vücuduna giren her leishmania hastalık oluşturmaz. Parazitin kandan temizlenmesini, retiküloendotelyal hücreler üslenir. Böylece bu hücreler bir yandan proliferer olurken, diğer yandan da herbirinde irileşme görülür. Sonuç olarak her organ, retiküloendotelyal elemanlardan zenginliği oranında patolojik anatomik değişiklikler gösterir. *Leishmania donovani* enfeksiyonlarında, vakaların hemen hemen 1/3'ünde oküler lezyon görülür. Burada çok defa retinada multipli kanama odakları vardır. Bunlar kan kapillerlerindeki lezyonlara bağlıdır. Kapiller lezyonlar burun ve diş eti kanamalarına da neden olabilir.

Genellikle parazit ihtiva eden irileşmiş histiositlere akciğerlerin alveolar septumları ve peribronşial kısımlarında, böbreklerin glomerüler kapillerlerinde, sürrenallerin sinüzoid hücrelerinde, pankreas ve testisin interstisyel bağ dokusunda ve diğer organlarda da

rastlamak mümkündür. Bütün bu lokalizasyonlarda plazmosit ve lenfosit infiltrasyonu bulunur (3, 21, 24, 38).

2. 2. 5. VL ve HIV

VL 1986 yılında VL - HIV ilişkisinin ortaya konması ile farklı bir boyut kazanmıştır VL, HIV ile enfekte hastalarda ilk fırsatçı enfeksiyon olabileceği gibi AIDS'in terminal dönemini koplike edebilir. Güney Avrupa'da AIDS'lilerde veya immunsupresif kişilerde hastalığa yakalanma riski oldukça yüksektir. Bu hastalarda; akciğer, plevra, oral mukoza, özofagus, mide, ince barsak, deri ve kemik iliği tutulumu olduğu gibi hastalık asemptomatik olarak da seyredebilir. VL'in endemik olduğu bölgelerde HIV'le enfekte bireylerde açıklanamayan semptomlar veya hepatosplenomegali varsa VL akla gelmelidir (39).

Birçok Avrupa ülkesinde AIDS'li vakaların % 9'unda VL saptanırken, VL'li yetişkinlerin % 70'inde HIV enfeksiyonu saptanmıştır. Leishmania ve HIV birlikte bulundukları hastalarda aynı hücreleri tuttuğundan hastalık ağırlaşmakta ve yaşam süresi kısalmaktadır (40, 41, 42).

2. 2. 6. İmmünite

Leishmania donovani'ye karşı bazı insanlar doğal dirence sahiptirler. İnsanlarda leishmania enfeksiyonlarına karşı antikorlar ve hücre aracılığıyla bağışıklık gelişmektedir. Leishmaniasis hücresel immünite çalışmaları için oldukça uygun bir model oluşturmaktadır. Parazitin yüzeyinde bulunan iki proteinin, nötral bir proteaz olan gp 63 ve lipofosfoglikan (LPG)'ın parazit-makrofaj etkileşiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Parazitin makrofaja tutunmasının ardından aktif fagositoz gerçekleşir ve parazite benzer bir vakuol oluşur. Daha sonra bu vakuol ile lizozomların membranları birleşir, ancak bazı yüzey antijenleri ile nötral proteazların yardımıyla parazit burada sindirilememekte ve promastigot formundan, amostigot formuna dönüşerek replikasyona

uğramaktadır. Amastigotlarla dolan makrofaj bir süre sonra patlar ve ortama salınan amastigotlar yeni makrofajları enfekte ederler (43).

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, leishmania enfeksiyonlarının rezolüsyonunun veya re-enfeksiyonun önlenmesinin genetik olarak hassas konaklarda, hücresel immun olaylara bağlı olduğu gösterilmiştir. Inbred fare suşlarında, enfeksiyona karşı olan hassasiyetin otozomal olarak nesillere aktarılan 1. kromozomda bulunan gene bağlı olduğu gösterilmiş ve Lsh olarak adlandırılmıştır. Aynı genin Salmonella typhimurium ve Caimette-Guenn bacillus (BCG)'a karşı olan hassasiyeti kontrol eden genetik lokus olduğu gösterilmiştir, insandaki genetik bölgeler ise tam olarak henüz tanımlanmamıştır. Hassas farelerde hastalığın seyri, koruyucu immun cevap arasındaki etkileşime bağlı olup burada da ağırlıklı olarak T lenfositlerinden sentezlenen lenfokinlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir (44, 45).

2. 2. 7. Vektörler

İnsana kala-azar, şark çıbanı, ve tatarcık humması gibi hastalıkları bulaştıran Phlebotomus (tatarcık) cinsi sineklerdir (1 2). Sıcak ve nemli bölgelerde yaşıyan bu sineklerin dişileri kan emerken leishmaniasis hastalığını bulaştırdıkları gibi, birtakım deri lezyonlarına da neden olabilirler. Sıcak ve tropikal bölgelerde bulunan Phlebotomidae ailesinde 600 kadar tür vardır (23, 32).

Sinekler; doğada kemirgen, kaplumbağa, kertenkele ve kuş yuvaları ile yabanıl hayvanların inlerinde, mağara ve ağaç kovuklarında, ayrıca evlerin ve ahırların içinde, duvarların çatlak ve deliklerinde, çevredeki taş yığınları gibi nemli, loş ya da karanlık, rüzgar almayan ve sessiz yerlerde yaşarlar. Gündüzleri kuytu yerlerde gizlenen tatarcıkların dişileri gece barınaklarındaki memelilerden kan emerek beslenirler. Çok yüksek bölgelerde yaşayabilen tatarcıklar İlkbahar ve Yaz aylarında görülür. Evlere girer ve cibinlikten geçebilir. İyi uçamaz ve yetiştiği bölgeden uzaklara gidemez. Bu sinekler ancak rüzgarsız gecelerde

dolaşırlar. Gürültüsüz, yavaş, kısa mesafelerde kona kona uçar, engele rastlarsa sıçrama hareketi yapar.

Tataarcıkların dişileri kan emdikleri halde erkekleri ya hiç besin almazlar yahut son larva safhasında aldıkları besinle hayatlarını devam ettirirler. Erkekler 4 gün, dişileri bir ay kadar yaşayabilirler. Dişi tataarcıkların kan emmesi 4-5 dakika kadar sürer ve 2 günde bir kan emebilirler (21, 24, 33, 46).

Tataarcıkların coğrafi dağılımında ısı önemli faktördür. 20°C'nin altında larva gelişimi ve erişkin aktivitesi oldukça azalır. Bu nedenle tataarcıklar en az bir ay ortalama 20°C ısıya sahip olan bölgelerde bulunurlar. Yaklaşık olarak 70 kadar tataarcık türünün leishmaniasis'e vektörlük yaptığı sanılmaktadır. Bunların ancak az bir kısmı vektörlük yönünden incelenebilmiştir. Diğer türlerin vektörlük yaptığı tespit edilmemiştir. Phlebotomus cinsinde Larrousius, Phlebotomus ve Paraphlebotomus alt cinsleri bilhassa önemlidir. Bunlardan Larrousius alt cinsindekiler *L. donovani* ve *L. aethiopica*'yı; Phlebotomus alt cinsindekiler *L. majör*'ü, Phlebotomus alt cinsi *L. tropica*'yı bulaştıran vektörlerdir. Lutzomyia cinsindeki Nyssomyia ve Psychodopygus alt cinsleri Amerika kıtasında bulunur ve *L. mexicana* ve *L. braziliensis*'i bulaştırırlar. Doğu'da (Türkiye, İsrail, Suriye, Ürdün, Suudi Arabistan, İran) *Phlebotomus ferfiliewi*, *P. alexandri*, *P. papatasi*, *P. ansarii*, *P. caucasicus*, *P. manyolensis*, *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. simii*, *P. tobbi* leishmaniasis'e vektörlük yapmaktadır. Türkiye ve Orta Asya'da *P. alexandri* leishmaniasis'i bulaştıran önemli bir vektördür (1, 20, 35).

PHLEBOTOMUS CİNSİ

Alt cins Adlerius

Alt cins Phlebotomus

Phlebotomus chinensis balcanicus

Phlebotomus chinensis halepensis

Phlebotomus papatasi

Phlebotomus chinensis kyrenia

Phlebotomus chinensis brevis

Alt cins Paraphlebotomus

Phlebotomus cimisi

Phlebotomus alexandri

Phlebotomus jacusieli

Phlebotomus sergenti

Alt cins Laroussius

SERGENTOMYIA CİNSİ

Phlebotomus major

Sergentomyia minuta

Phlebotomus major neglectus

Sergentomyia dentata

Phlebotomus kandelakii

Sergentomyia dentata dentata

Phlebotomus perfiliewi Parrot

Sergentomyia dentata arpaklensis

Phlebotomus perfiliewi galileus

Sergentomyia fallax

Phlebotomus perniciosus

Sergentomyia theodori

Phlebotomus wenyoni

Sergentomyia pawlowskyi

Türkiye'de tesbit edilen tatarcık türleri

2. 2. 8. Rezervuarlar

Hindistan'da çocuk ve genç erişkinlerde sık görülen *L. donovani* için rezervuar hayvan yoktur. Endemik olarak görüldüğü Kuzey Çin'de ve Orta Asya'da rezervuar köpeklerdir (32). Epidemik olarak Sudan başta olmak üzere Doğu Afrika'da çocuklarda ve genç erişkinlerde enfeksiyon sporodik olup rezervuar kemiriciler (sıçan, gerbil) küçük etçillerdir. Akdeniz çevresi ülkeler (Türkiye dahil), Orta Doğu'da sporadik olgular şeklinde küçük çocuklarda nadiren erişkinlerde, immün sistemi baskılanmış kişilerde (AIDS ve transplantasyondan sonra) enfeksiyon görülür. Endemik bölgedeki AIDS'lilerin % 1 - 5'inde kala-azar belirtileri vardır. Rezervuar; sıçanlar, köpekler ve köpekgilerdir. Güney Avrupa'da (İspanya, Fransa, İtalya) köpeklerin % 3 - 20'si seropozitifdir, bunların yarısı

asemptomatiktir. Kuzeydoğu Brezilya'da çoğunlukla çocuklarda görülen kala-azar'ın rezervuarı köpekler ve tilkilerdir. Ülkemizde ise bu hastalığın rezervuarı köpeklerdir (5, 21, 28, 35, 41, 47).

2. 2. 9. Tanı ve Ayırıcı Tanı

Tanıda epidemiyolojik veriler, klinik ve laboratuvar bulguları ile serolojik tanı yöntemleri önem taşımaktadır. Etkensel tanı ise her zaman için ön plandadır. VL'in laboratuvar tanısı tedavi edilmemiş vakalarda oldukça kolay, nüküslerde ve yetersiz tedavi uygulanmış hastalarda zordur. Ayırıcı tanıda VL ile sıtma, bruselloz, verem, döneke humma, tifo, paratifo, sepsis, histoplazmoz gibi hastalıklarla karıştırılabilir. Hodgkin enfeksiyöz hepatit, enfeksiyöz mononükleoz, lösemi chagas hastalığı, akut şistozomiyaz, hepato-splenik şistozomiyaz, PKDL, lepra ve sifilisten ayırt edilmelidir. Banti hastalığı tanımı ile hastaneye gönderilen vakalar da vardır. Bunlardan dolayı tanımında laboratuvar metodlarının önemi fazladır. Kala-azar'la sıtma birlikte bulunabilir (2, 20).

Kala-azar sonrası deri leishmaniasis'i lepra ile karıştırılabilir. Dalak büyüklüğü, anemi ve lökopeni, başlangıçta günde iki defa yükselen, sonra düzensiz olan ateş, taşikardi, dilin temiz olması klinik olarak kala-azarı düşündürür. Bu tanı laboratuvar muayenesi ile desteklenmelidir. Endemik bölgelerde uzun süren ateş, ilerleyici kilo kaybı, hepatosplenomegali, pansitopeni ve hipergamaglobulinemi VL akla getirmelidir (1, 2, 3, 24, 47).

Bazı vakalarda parazit kandan üretilmekte, nadiren de direkt mikroskopi ile mononükleer hücrelerde görülebilmektedir. Ancak HIV'li VL hastalarda periferik yaymalarda leishmania'nın amastigot şekillerinin görülme oranı % 50 dir (39, 40, 48).

Kültür genellikle bifazik Novy-MacNeal-Nicolle (N.N.N.) besiyerinde yapılır ve bu besiyerinde oda sıcaklığında 3-4 hafta içinde ürerler (21, 49).

Serolojik olarak tanıda Formol-jel reaksiyonu, ELISA ile Leishmania Ig G, Indirekt Floresans Antikor (IFA) ve PCR yöntemleri kullanılır (50-56).

2. 2. 10. Tedavi

Dünyada; 16'sı gelişmiş, 72'si gelişmekte olmak üzere toplam 88 ülkede endemik olduğu bildirilen leishmaniasis'in, kontrol altına alınmasında en önemli nokta, hastaların etkin olarak tedavi edilmesidir. Özellikle tek rezervuarın insan olduğu antroponik VL tedavisinde, uygulanan tedavi mortalite ve morbiditeyi azaltmakta, hastalığın ve parazitin kontrolünü sağlamaktadır (38, 57).

Leishmaniasis tedavisinde uygun ilacın seçimi önemlidir. Çünkü *L. donovani* ve *L. tropica* gibi antroponotik türlerde ilaç direnci ile karşılaşilmektedir. Diğer leishmaniasis etkeni türler, genellikle zoonotik karakterdedir ve bu sebeple ilaç direncinin yayılımı pek mümkün değildir. VL tedavisinde, olguların kliniği, etken türler ve hastanın yaşadığı bölge dikkate alınmalıdır (1, 2, 20, 58, 59, 60).

VL tedavisinde ilaç kullanımı; VL, CL, mucocutaneus leishmaniasis (MCL) ve diffuz cutaneus leishmaniasis (DCL) olarak dört farklı klinik tabloya neden olan leishmaniasis'in tedavisinde, halen en yaygın kullanılan ilaç grubu pentavalan antimon bileşikleridir (59). Günümüzde bu ilacın iki pentavalan antimon bileşiği kullanılmaktadır. Sodyum stiboglukonat (Pentostam®) 100 mg/ml antimon (Sb^V) içerirken, meglumin antimoniyat (Glucantime®)'da 85 mg/ml antimon (Sb^V) bulunur. Her iki ilaç da intravenöz (IV) veya intramuskuler (İM) yoldan uygulanır ve eşit antimon dozlarında etkinlikleri aynıdır. Önerilen tedavi dozu, 4 hafta boyunca günde tek sefer enjekte edilen, 20 mg/kg/gün Sb^V şeklindedir. WHO tarafından tek seferde uygulanabilen en düşük doz 200 mg Sb^V ve en yüksek doz 850 mg Sb^V olarak tavsiye edilmektedir. Antimonların parenteral uygulanma yolu, uzun tedavi süresi ve yan etkileri gibi dezavantajları vardır. Sistemik yan etkileri genellikle doza bağlıdır. Halsizlik, EKG değişiklikleri, aminotransferaz seviyesinde

artma ve kimyasal pankreatit sık fakat genellikle reversibl yan etkilerdir. Böbrek fonksiyonlarının bozulduğu durumlarda, ilaç atılımı bozulacağından doz azaltılmalıdır (60, 61, 62).

Antimonlara dirençli VL tedavisinde; pentamidin, paromomisin (aminosidin), allopürinol, amfoterisin B ve yağlı formülasyonları, miltefosine, ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, terbinafin ve metronidazol gibi ilaçlarda kullanıla bilir (63).

Leishmania - HIV koenfekte hastalarda uygulanacak tedavi konusunda halen bir fikir birliği bulunmamaktadır. Pentavalan antimoniyaller veya amfoterisin B kullanımının etkin olmasına karşın, toksisiteleri ve uzun süreli kullanımları nedeni ile endişe uyandırmaktadırlar. Amfoterisin B lipid formüllerinin kullanımı daha iyi tolere edilebilir ve kısa süreli kullanılabilir (64, 65).

Tedavinin değerlendirilmesi

Genel olarak VL tedavisinin başlangıcından sonraki bir kaç gün içinde hasta kendini daha iyi hisseder ve ateş düşer. Kan tablosunun iyileşmesi ise 2. veya 3. hafta da başlar. Eozinofil sayısının artması veya normal seviyesine gelmesi tedaviye bir cevap olarak kabul edilebilir. Dalak birkaç hafta içinde küçülmeye başlar. Splenomegalinin devam etmesi durumunda ise, tedaviye cevapsızlık, relaps veya sıtma gibi diğer bir hastalığın eşlik ettiğini akla getirilmelidir. Serolojik iyileşme ancak aylar içinde gözlenir. Tedavinin başarılı olduğu, tedavi bitiminden 1-2 hafta sonra yapılan kontrol smearleri ve kültür ile karar verilir (66, 67).

2. 2. 11. Prognoz

Tedavi edilmeyen kala - azar vakaları, genellikle birkaç yıl sürer. Fakat Afrika'daki vakalar kısa sürede tekrar akut faza dönüşerek 5 ay içinde ölümle sonuçlanır. Tedavi edilmeyen kala-azar vakalarında mortalite % 90'a kadar yükselir, ancak tedavi edilen olgularda bu oran % 1.5-3.4 arasında değişir. Vakaların % 20'si subklinik olarak seyreder. VL'de ölüme;

kontrol edilemeyen hemoraji, ciddi anemi, sepsitemi, pnömöni ve dizanteri neden olmaktadır (1, 47).

2. 2 . 12. Korunma ve Kontrol

Leishmaniasis'in kontrolü için kişisel korunma tedbirleri artırılmalıdır. Halkın eğitiminin sağlanması, her yaş grubunda ve her düzeyde kişiler için gerçekleştirilmelidir. Okul çağındaki ve işyerlerinde bulunan kişiler büyük ve önemli grupları oluşturmaktadır. Bu gruplardaki kişilere hazırlanacak uygun programlara eğitim verilmeli ve eğitim için radyo, televizyon programları posterler, resimler, filmler, toplantılar gibi imkanlardan yararlanılmalı, bilginin tam ve doğru olarak verilmesi, mesajların anlaşılır olması sağlanmalıdır. Tatarcık sineklerinin gelişme alanlarının ortadan kaldırılmalı, insektisid tatbikatı. Dimetil ftalat ve bimetilksantogenin % 4'lük vazelin merhemi ve repellent olarak kullanılmalıdır. Kemirgen kontrolü ve bunların yuvalarının sürülerek bozulması tatarcık popülasyonunu azaltabilir (2, 21, 37, 68).

Gelişen dünyada; ekonomik büyüme, yeni tarım projeleri, immun olmayan insanların göçü, kentleşme, insan eliyle yapılan çevre değişiklikleri, baraj ve sulama sistemlerinin yapımı, yeni tarım ürünleri hastalığın artması için ana sebepler olarak düşünülmektedir. Bu durumu göz önüne alan Dünya Sağlık Teşkilatı, her ülkede bulunan üyeleriyle işbirliği İçinde hazırladığı kontrol programları yanında, ulusal çapta eğitim kursları, workshoplar, seminerler, dünya çapındaki epidemiyolojik verilerin güncelleştirilmesi, teknik dökümanların hazırlanması ve kontrol ağırlıklı araştırma projelerinin desteklenmesi gibi hizmetleri de yürütmektedir (21, 28, 57, 69).

2. 3. Leishmanianın Laboratuvar Tanısı

2. 3. 1. Etkensel Tanı

Tedavi edilmemiş yoğun parazitemili olgulardan kandan ince yayma Giemsa ile boyanması ile kemik iliği, dalak, lenf bezi aspirasyonlarının veya kanın N.N.N kültüründe üretilmesi ile tanı konur (20,49).

2. 3. 1. 1. Direkt

Kan, kemik iliği ve dalak ponksiyon materyali ve karaciğer aspirasyonundan hazırlanan yayma preparatlar Giemsa ile boyanır ve mikroskobun (10X100) büyütmesinde incelenir. Kemik iliğinde parazit ilk enfeksiyonlarda % 94, relapslarda % 64 oranında bulunur. Dalak ve karaciğer aspirasyonunda parazitin bulunma oranı % 96 -98'dir. Ancak her iki yöntemde de hayatı tehdit edici derecede kanama riski vardır. Eğer büyümüş lenf nodu varsa oradan da biyopsi yapılabilir. Tanıda kemik iliği aspirasyonu en güvenli yöntemdir (15, 20, 54).

2. 3. 1. 2. Kültür

Kala-azar'lı hastalardan alınan kemik iliği, karaciğer, dalak ponksiyon materyalleri ya da sitratlı kan leishmaniasis'in tanısı için en eskiden beri kullanılan ve günümüzde de en uygun olan N.N.N. besiyerine ekilir. 23-25°C'lik etüvde 21-30 gün inkübe edilir. Besiyerlerinde leishmania'nın ara şekli olan promastigotların üremesiyle kesin tanı konur (2,13,15, 20, 49).

Leishmania üretiminde kullanılan diğer besiyerleri

- RPMI 1640
- Medium 199
- Schneider's Drosophila Medium
- Nutrient Broth sayılabilir.

Ancak etkenin izolasyonu için N.N.N. besiyeri kullanılmalı ve üremeyi takiben istenirse diğer sıvı besiyerlerine aktarılmalıdır.

Hayvan inokulasyonları; ponksiyon materyallerini laboratuvar deney hayvanlarına inoküle edilerek, bunların iç organlarında leishmania'ları görmekle de tanıya gidilebilir (21, 49).

2. 3. 2. İndirekt yöntemler

Kala-azar olgularında gamma-globulinlerde artma ve albumin miktarında azalma olduğu bilindiğinden, şüpheli hastalarda globulin-albumin oranını saptamak gerekmektedir. Kala-azar hastalarının serumundaki immun globulin artışları genellikle IgG ve bazen de IgM

şeklinde dir. Albumin-globulin oranının değ işmesi esasına dayanarak geliştirilen bazı testler Kala-azar'ın tanısında kullanılmaktadır. Bunlardan Napier'in Aldehit (Formol-Jel) testi, Chopra'nın Antimon ve Şia'nın presipitasyon testlerini sayabiliriz (2 ,49).

Formol-Jel (Napier'in Aldehit)

Hasta serumunda artan globulinleri saptamak için yapılan bir test olup, yapılı şı kolay ve ucuz bir tanı yöntemidir. 1 ml hasta serum üzerine % 40 lik formalinden 1 veya 2 damla damlatılır. Sonuçları bir gün sonra okunur (2).

Chopra'nın Antimon Reaksiyonu

Bir tüp içine 0.5-1 cm³ hasta serumu konur. 1/5 -1/10 oranında damıtık su ile sulandırılır. Beş değerli antimon bileşiminin (urea stibamin) damıtık sudaki % 4 eriyi ği taze olarak hazırlanır. Bu eriyikten serumun üzerine birkaç damla konur. Tüp iki el arasında yuvarlanarak karış tırılır. Pozitif olgularda 10-15 dakikada (bazen 1-2 saatte) bir bulanıklık ve kümeleş me oluşmaktadır (2, 15).

Leishmanın Deri İçi Testi (Montenegro Reaksiyonu)

İlk kez Montenegro tarafından; kültürde üreyen *L. donovani* promastigot şekilleri fenolle inaktive edildikten sonra deri içine verilerek yapılan bir testir. 1 ml'sinde 6-10 milyon promastigot şekiller bulunan solüsyondan 0.1-0.2 ml deri içine verilir. Allerjik olan bu test 48-72 saat sonra okunur. Pozitif olgularda enjeksiyon yerinde 5 mm yada daha geniş bir eritem oluşur. Bu test Kala-azar olgularında başlangıçta negatif olup, tedavi sonrası veya kronik hale geçtikten sonra pozitifleşir. Genellikle epidemiyolojik çalış malarda kullanılır (1, 2, 21, 70).

Kompleman Birleşmesi Testi

Kala-azar tanısında kullanılan ilk serolojik testlerden birisidir. Bu test için antijen, enfekte deney hayvanlarının dalak ve karaciğerlerinden, *L. donovani* kültür formlarından ve asit - fast basillerden hazırlanmaktadır. Kompleman Birleşmesi testinin esası; antijenin bağış ık

serumlar ile karıştırılıp, bu karışıma kompleman eklendiğinde, antijenin özel antikoru ile birleşirken komplemanı da bağlayıp tesbit etmesidir (70).

2. 3. 3. Serolojik Tanı

Visseral Leishmaniasis'in düşünülmesi durumunda tanıda yardımcı olmak amacıyla dünyanın birçok bölgesinde olduğu gibi ülkemizde de yüksek duyarlılık ve özgüllükte olan serolojik testler uygulanmaktadır. Serolojik yöntemlerde amaç akut fazda artan anti-paraziter antikorların titrelerini tayin ederek tanıya yardımcı olmaktadır. Serolojik testlerin pozitif olması leishmaniasis'de çok değerli olmakla birlikte seronegatif vakalarda diğer parazitolojik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısı ile birden fazla test uygulamanın serolojik tanının değerini arttırabileceği bildirilmektedir (71).

Uzun zamandır uygulanan İndirekt Fluoresan Antikor (İFA) testine ek olarak ELISA, rK39 antijeninin kullanıldığı dipstick testi ve Direkt Aglütinasyon Testi (DAT) , İndirekt Hemaglütinasyon Testi (IHA)'de antileishmanial antikorların saptanması için rutinde ve sero-epidemiolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda tanıya yardımcı olmak üzere Western Blotting testi'de kullanılmaya başlanmıştır (4,12).

2. 3. 3. 1. İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT)

Goldman tarafından geliştirilen Fluoresan antikor testi Amebiasis'de patojen amiplerin ayırımında kullanılmasından sonra, diğer protozoon ve helmint hastalıklarının tanısında da kullanılmaya başlanmıştır. Kala - azar hastalığının tanısında kullanılan bu test, tüm immunoparazitoloji laboratuvarlarında uygulanmaktadır. Leishmania'nın promastigot şekilleri antijen olarak kullanılır (70).

2. 3. 3. 2. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Parazit hastalıklarının etkenleri direkt olarak görülemediği veya görülmesi zor olduğu zamanlarda bu hastalıkların tanısının yapılabilmesi için uygulanmakta olan serolojik tanı yöntemlerinden olan bu yöntem Enzyme Immun Assay (EIA) olarak da

isimlendirilmektedir (72). Şüpheli materyalde ya antikor ya da antijen aramak amacı ile kullanılmaktadır. Esas olarak oluşturulan antijen-antikor kompleksine enzim ile işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Visseral leishmaniasis'in tanısında ve seroepidemiolojik çalışmalarda kullanılan önemli testlerden biri olarak kabul edilmektedir. Promastigot veya amastigotlardan elde edilen eriyik antijenlerini kullanılabilesinin yanında son zamanlarda ELISA çalışmaları daha spesifik olan rekombinant Leishmania antijenlerin (gp63, rK39, gp70-2 ve dp 72) kullanıldığı testler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu yöntem ilk kez 1971 yılında Engvall ve arkadaşları tarafından tarif edildikten sonra Malaria, Uyku hastalığı, Chagas, Amoebiasis, Toxoplasmosis, Leishmaniasis ve helmint hastalıklarının serolojik tanısında başarı ile uygulanmıştır (14, 72, 73).

2. 3. 3. 3. Western Blot

Eriyik Leishmania antijeni ve moleküler standartlara Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) poliacrylamide jel elektrofrezisi uyguladıktan sonra jeldeki polipeptidler nitrosellüloz membrana geçirilmektedir. Bu membran, 3 mm genişliğinde uzunlamasına kesilerek normal ELISA işlemi uygulanmaktadır. ELISA da olduğu gibi spesifik antijenler kullanılabilmektedir. VL hastalarının serumları 12-120 kD arasında moleküler ağırlıktaki bir çok antijeni kapsamaktadır. 14-16 kD antijenleri leishmaniasis için en yüksek hassasiyeti göstermektedirler. Aynı şey AIDS'li hastalarda da geçerli sayılmaktadır. Bazı vakalarda 14 kD bantı bulunmasa da 16 kD'luk bant mutlaka saptanmaktadır. Endemik bölgelerdeki VL hastalarının tanımlanmasında 14-16, 22, 24 kD antijenlerine karşı antikorlar kullanılırken epidemiyolojik çalışmalarda 14 kD ve 16 kD antijenlerine karşı antikor taramanın değerli bir tanı aracı olduğu belirtilmektedir (74).

2. 3. 3. 4. Direkt Aglütinasyon Testi (DAT)

Sıvı besiyerlerinde üretilen *L. infantum* promastigot şekilleri soğuk Locke solüsyonu ile yıkanır ve % 0.4 Trypsin ile muamele edildikten sonra Formaldehit ile fikse edilir. Sodyum sitratlı serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra % 0.02'lik Coomassie Brilliant Blue ile promastigotlar boyanır, daha sonra tekrar sodyum sitratlı serum fizyolojik ile yıkanır ve promastigot miktarı % 0.43'lük Formaldehit ile son konsantrasyona getirilir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanır.

Hasta serumu Gelatin ve 2-Mercaptoethanol içeren sıvısı ile sulandırılır. Sulandırma kullanılan serum veya kan örneğinin nereden alındığına göre değişebilmektedir (21, 70, 75).

2. 3. 3. 5. İndirekt Hemaglütinasyon Testi

Bu yöntemde sadece eriyik antijenler kullanılmaktadır. Eriyik antijenle N.N.N. ve diğer besiyerlerinde üretilen leishmania'nın promastigot şekillerden hazırlanır. Eriyik promastigot antijen solüsyonu -70°C'lik derin dondurucu veya liyofilize edilerek kullanılacağı zamana kadar saklanır. İnsan veya koyun eritrositleri uygun fosfat tampon solüsyonu ile veya FTS ile yıkandıktan sonra tannik asit ile duyarlaştırılan eritrositler antijenle kaplanır (70.)

2.3.4. Leishmaniasis Tanısında Moleküler Yöntemler

İnfekte organlardan elde edilen örneklerde, genelde parazitin az miktarda veya atipik morfolojide bulunması, kültür yöntemindeki kontaminasyon riski gibi nedenlerle *Leishmania* parazitlerinin saptanmasında güçlükler olabilmektedir. Parazitin direkt saptanmasına yönelik yöntemler güvenli olmasına karşın hassasiyet düşüktür. Bu nedenle hasta kanı gibi kolaylıkla elde edilebilecek bir örnek kullanılarak PCR uygulanabilir. Tanıda kullanılan serolojik metotlar, daha önce parazit ile karşılaşılıp karşılaşmadığının bir göstergesi olarak yardımcı, duyarlı ve özgüdür. Ancak, immünitesi baskılanmış kişilerde güvenli değildir. Eski ve yeni olguları tam olarak ayıramayabilir. Diğer patojenlerle çapraz

reaksiyonlar olabilir. Moleküler tekniklerde, incelenecek örneğin az miktarda olması ya da örnekte parazitin az olması testi fazla etkilememekte, örnekten birkaç farklı inceleme yapılmasına olanak sağlamaktadır. *Leishmania* türlerinin saptanması ve tanımlanması için genellikle her parazitte birçok kopyası bulunan "maxisirküler" ve "minisirküler" kinetoplast DNA'sı (KDNA) hedef seçilmektedir. Ayrıca sitoplazmada ve nükleusta çok miktarda kopyası bulunan 16S rRNA genleri, küçük alt ünite rRNA genlerinin belli kısımlarından hazırlanan probların kullanıldığı PCR ile, parazitler spesifik ve duyarlı olarak tanımlanabilirler (13, 53, 54, 76, 77, 78, 79).

2. 3. 4 . 1. Moleküler Tanı PCR(Polymerase Chain Reaction)

Moleküler tanımlama yöntemleri son 10 yılda çok hızlı bir şekilde gelişmiştir. "Polymerase chain reaction" (PCR) 1987 yılında Kary B. Mullis tarafından tarif edilmiştir. 1988 yılında Saiki yöntemi ilk olarak tanıda kullanmıştır. Saiki'nin "Thermus aquaticus" Taq DNA polimerazı bulması ile yöntem yaygınlık kazanmıştır (80).

İlk çalışmalar manuel yöntemlerle su banyolarında uygulandığından, sadece referans laboratuvarlar için uygun bir yöntem olarak tarifiyenirken şimdi, neredeyse her özel laboratuvar da bile bulunmakta ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerin geliştirildiği ülkelerde paraziter hastalıklara az rastlanması ve paraziter hastalıkların çok olduğu bölgelerde de bu yöntemlerin maliyetinin yüksek olmasından dolayı parazitolojide kullanımı geç olmuştur.

PCR, nükleik asitlerin in-vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Hücre içinde gerçekleşen doğal DNA replikasyonu PCR ile bir tüp içinde taklit edilir. Uygulanmakta olan birkaç tipi vardır. Bunlar Multipleks PCR : Aynı tepkime tüpü içine birden fazla bölgeyi çoğaltacak primerler konarak yapılır. Nested PCR : Amplifiye edilen bölge içinde daha küçük ayrı bir bölge daha çoğaltılır. Kantitatif PCR: Belirli sayıda kopya içeren örneklerle

bilinmeyen örnek amplifiye edilerek karşılaştırılır ve bilinmeyen örnekte kaç kopya bulunduğu saptanır.

RT-PCR: Çoğaltılacak hedef nükleik asit RNA ise revers transkriptaz enzimi ile önce DNA'ya çevrilir, sonra PCR ile çoğaltılır. Leishmaniasis'in PCR ile tanısı önemlidir. PCR ile leishmaniasis'in saptanması ve suşların identifikasyonu yapılabilmektedir (13, 69, 78, 81, 82, 83 84).

2. 3. 4 . 2. Nükleik Asit Saptama Yöntemleri

Nükleik asit saptama yöntemleri mikrobiyolojik tanıda en sıklıkla kullanılan yöntemlerdir.

Bu yöntemler hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olarak iki başlık altında toplanabilir (79, 81, 85).

I. Hibridizasyon Yöntemleri

Hibridizasyon birbirine uyumlu şifreye sahip iki molekülün özgül olarak birleşmesi anlamına gelir. Nükleik asitler şifreleri birbirine uyumlu ise hibrid oluşturabilirler. Hibrid oluşturabilmek için DNA moleküllerinin denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmeleri gereklidir. Hibridizasyon yöntemleri için genellikle nükleik asit probları kullanılır. Nükleik asit probları DNA veya RNA'dan oluşur, çeşitli enzimler, antijenler, kemiluminesans bileşikler ya da radyoizotoplarla işaretlenmiş ve aranan hedef nükleik asite yüksek özgüllükte bağlanabilen dizilere sahip moleküllerdir. Problar hem RNA hem de DNA hedeflerine yöneltilebilir. Uzunlukları 20 baz ile binlerce baz boyunda oluşturulabilir. Hibridizasyon yöntemleri likit faz hibridizasyonlar, solid destekli hibridizasyonlar ve in situ hibridizasyonlar olarak üç şekilde uygulanabilir (77, 79, 81, 85).

a. Likit Faz Hibridizasyonlar

b. Solid Destekli Hibridizasyonlar

c. İn Situ Hibridizasyonlar

II. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri

İn vitro nükleik asit amplifikasyon yöntemleri günümüzde oldukça yaygın kullanım alanı bulmuştur. Son yıllarda, özellikle rutin laboratuvarlarda mikrobiyolojik tanı amacıyla otomatize sistemler yaygınlaşmıştır (76, 81).

Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri 3 genel kategoriye ayrılabilir:

- a.** Nükleik asitte hedef bölgenin çoğaltılması
- b.** Nükleik asit üzerinde özgül problemlerin çoğaltılması
- c.** Sinyal çoğaltılması

2. 3. 4 . 3. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

Moleküler tiplendirme yöntemleri üç geniş kategoride toplanır (76, 84, 85) .

- a.** Lipopolisakkarit (LPS) ve yağ asidi kullanılan yöntemler
- b.** Protein kullanılan yöntemler
- c.** Nükleik asit kullanılan yöntemler
 - DNA Dizi Analizi
 - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
 - Plazmid Analizi
 - Hibridizasyon Yöntemleri
 - PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

2. 4. Tıbbi Kusur (Malpractise)

Malpraktis beceri veya özen eksikliği olan mesleki hatalar için kullanılır. Bu hata tıp alanını ilgilendiriyorsa, tıbbi uygulama hatası ya da "tıbbi malpraktis" den söz edilir. Dünya Tabipler Birliği ise malpraktisi (tıbbi yanlış uygulama), "hekimin tedavi sırasında standart güncel uygulamayı yapmaması, beceri eksikliği veya hastaya tedavi vermemesi ile oluşan zarardır", şeklinde tanımlamaktadır. Ancak "tıbbi uygulama sırasında; öngörülemeyen bilgi ya da beceri noksanlığı sonucu oluşan zararın istenmeyen sonuç olduğuna ve bunda hekimin sorumluluğu olmadığına" dikkat çekmektedir (86, 87, 88).

Hekimlik tüm meslekler arasında insan ile en yakın ilişkisi bulunan meslektir. Hekimin bu ilişkisi başlıca koruyucu ve tedavi edici hekimlik şeklindedir. Hekimlerin uymakla yükümlü olduğu mesleki ve etik kurallar genel olarak yasal sorumluluklarının da esasını oluşturur (89, 90).

Bu konuda ülkemizde "Tıbbi Deontoloji Nizamnamesi" ilkeleri günümüz koşullarında bazı hususlarda yetersiz kalmakla birlikte genel olarak önemli bir dayanaktır. Etik kuralların bazen mevcut yasalarla uyumsuzluk göstermesine karşın, yasalar hekimler için bağlayıcı niteliktedir. Kuskusuz bazı konularda yasa, tüzük ve yönetmeliklerin etik ve hukuki açıdan tartışılması ve yeniden düzenlenmesi zorunludur. Ülkemizde hekimin hem genel mesleki hem de adli olgular açısından faaliyet ve sorumluluklarını düzenleyen özel bir yasa olmamakla beraber, çok sayıda kanun, tüzük ve yönetmelik bulunmakta olup, bunların en önemlileri şunlardır (89, 91).

- 1219 sayılı Tababet ve Şuabatı Sanatlarının Tarzı İcrasına Dair Kanun
- 1519 sayılı Umumi Hıfzısıhha Kanunu,
- 6119 sayılı Adli Tıp Müessesesi Kanunu,
- 2219 sayılı Hususi Hastaneler Kanunu,

- 3153 sayılı Radyoloji, Radium ve Elektrikle Tedavi ve Diğer Fizyoterapi Müesseseleri Hakkında Kanun,
- 38 sayılı Tababeti Adliye Kanunu,
- 6023 sayılı Türk Tabipleri Birliği Kanunu
- Türk Medeni Kanunu
- Borçlar Kanunu
- Türk Ceza Kanunu
- Tıbbi Deontoloji Nizamnamesi
- Hasta Hakları Yönetmeliği

Bununla birlikte hekimlerin tıbbi kötü uygulamalardan doğan sorumluluklarını düzenleme altına almak amacı ile bir dönem “Tıbbi Hizmetlerin Kötü Uygulanmasından Doğan Sorumluluk Kanunu Tasarısı (Malpractice Yasası)” Türkiye Büyük Millet Meclisi gündemine alınmış ancak söz konusu bu tasarı henüz yasalaşmamıştır. Esasen Türk Mevzuatına serpiştirilmiş bu düzenlemeler tahtında, hekimlerin sorumluluklarını tespit edebilmek için, öncelikle uyulması gerekli tıbbi standartların ne olduğunu tayin etmek gerekmektedir. Zira hekimlerin tıbbi uygulamalara ilişkin sorumluluğu, uyulması gerekli standartlardan, hukuken kabul edilir bir gerekçe olmaksızın uzaklaşmaları durumunda söz konusu olacaktır.

Ancak bunun da öncesinde, sağlık çalışanlarından neden bazı standartlara uygun hareket etmelerinin beklendiğinin açıklanması gerekmektedir. Doktrinde iki sebebin ortaya konulduğu görülmektedir. Birinci sebep; hekimler, diğer insanlardan farklı olarak bir eğitime tabi tutulurlar ve bu eğitim sebebiyle edindikleri bilgiler onların meslek uygulamalarında, diğer insanlardan farklı davranmalarını beklememize neden olur. Diğer sebep ise; profesyonel bilgi ve beceri gerektiren uygulamaların değerlendirilmesinde, o mesleğin getirdiği standartlar ölçü alınmalıdır (92).

Hekimlik uygulamasında standardın tespiti için hangi kriter benimsenmesi gerektiği sorusuna verilecek cevaplar farklı olabilecektir

- Normal, ortalama bir hekimin bilgisi ölçü alınabilir,
- Hekimin lisans eğitiminde öğrendikleri esas alınabilir,
- Tıp fakültelerindeki güncel öğretiler esas alınabilir,
- Koşullar altında hekimin yapabileceğinin en iyisi ölçü olabilir,
- Meslek mensuplarının geneline kabul edilen ve uygulananlar esas alınabilir,
- Aynı koşullar altında diğer uzmanların ne yapacağı da bir ölçü olabilir (92).

Bu ölçülerin standart tıbbi uygulamayı tespit etmek için tek başına yeterli olamayacağı açıktır. Esasen standart tıbbi uygulamanın ne olduğunu tespit ederken, her duruma, her olaya ve her uygulamaya uygun bir tanım vermek mümkün görülmemektedir. Bununla beraber doktrinde standart uygulamanın tespiti için bazı ölçülerin esas alındığını ve kısıtlı tanımlamaların yapıldığını söylemek gerekir.

Bir işin belirlenen şekilde yapılması "standart" olarak tanımlanmaktadır. Snook' a göre tıbbi malpraktis, "hastanın yaralanmasına sebep olan, kabul edilmiş sağlık bakım ve beceri standartlarını sağlamada, sağlık bakım hizmeti sunan açısından, bir başarısızlık veya yanlış uygulama" olarak tanımlanmaktadır (93).

Bu durumda malpraktis, standartlardan sapma anlamına gelmektedir. Sağlık alanında malpraktis, "hizmetleri sunan hekim, hemşire ve ilgili mevzuata göre hastaya müdahale yetkisi bulunan fizyoterapist, psikolog veya diyetisyen gibi sağlık personelinin öneri ve/veya uygulamaları sonucu hastalığın normal seyrinin dışına çıkarak, hastalığın iyileşmesinin gecikmesinden hastanın ölümüne kadar geniş bir yelpazedeki şartların tümü"nü içermektedir.

Alton malpraktisi " bir hekimin kabul edilmiş tıbbi uygulama standartlarına göre yapılması gerekenden farklı biçimde teşhis ve tedavi yapmasıdır" şeklinde tanımlanmaktadır (94).

Dünya Tabipler Birliği ise malpraktisi (tıbbi yanlış uygulama), "hekimin tedavi sırasında standart uygulamayı yapmaması, beceri eksikliği veya hastaya tedavi vermemesi ile oluşan zarardır", şeklinde tanımlamakta, ancak "tıbbi uygulama sırasında; öngörülemeyen bilgi ya da beceri noksanlığı sonucu oluşan zararın istenmeyen sonuç olduğuna ve bunda hekimin sorumluluğu olmadığına" dikkat çekmektedir (Türk Tabipleri Birliği, 1998; 43) (95).

Standart tıbbi uygulamanın tespitine ilişkin en fazla kabul gören yaklaşım “(Hekimin) ortalama bir meslektaşının aynı veya benzer koşullarda göstereceği performansı göstermesi şeklindedir (92). Bu tanımdan, cevaplanması gereken başka bir soru çıkmaktadır: Standart tıbbi uygulamanın tespiti için referans alınacak ortalama hekim kimdir?

Referans alınacak hekimin kim olduğunun tespitinde önceleri “bölgesellik kuralı” kabul edilirken daha sonra iletişimin gelişmesi, düzenli eğitim programları, bilimsel toplantılar ve internet kullanımı gibi ilerlemeler sebebiyle bölgesel farklılıkların azalması bu kuralın eleştirilmesine neden olmuştur (92, 96, 97). Ve bölgesellik kuralının yerine, “ulusal standart” kuralının benimsenmesi önerilmiştir (98). Bugünlerde tıbbi standartların, bölgesel ve ulusal bazdan çıkarılıp, daha evrensel ölçülerin kabul edilmesi savunulmaktadır (99). Makul ve ihtiyatlı bir uzmanın benzer bir olayda nasıl davranması gerektiğine bakılarak, hekimin standartlara uygun davranıp davranmadığı tespit edilmeye çalışılmaktadır.

Türk hukukunda, standart tıbbi uygulamanın tespitinde hangi kriterlerin esas alındığına bakıldığında, üç temel ölçünün kullanıldığı görülmektedir. Bunlardan ilki, genel hayat tecrübelerine göre herkese yüklenebilecek dikkat ve özenin gösterilmesi gerekliliğidir (100,101,102). Diğer kriter ise orta seviyede tedbirli bir doktorun aynı hal ve şartlar altında göstereceği mutad ihtimam ve özenin gösterilmesidir (103). Son kriter tıp bilimini kurallarını gözetip uygulamaktır (104). Böylelikle hukukumuzda, bölgesellik kuralı ya da ulusallık kriterinin uygulanmadığını söylemek yerinde olacaktır. Nitekim, gerek ilk derece mahkemelerinde, gerekse de Yargıtay kararlarında, hekimin mesleki standartlara uyup

uymadığının araştırılmasında, üniversitelerin tıp fakültelerinde görevli uzman öğretim üyelerinin görüşüne başvurulmakta böylelikle, ülkenin neresinde faaliyet gösterirse gösterson, hekimlerin güncel ve geçerli yeniliklere uygun hizmet verip vermedikleri araştırılmaktadır (105,106). Esasen bu konuda mahkemelerin uzman bilirkişilerden beklentisi; “yapılması gereken” ile “yapılanın” mukayese edilerek hekimin standart uygulamanın dışına çıkıp çıkmadığının tespit edilmesidir (107).

Yargıtay kararları incelendiğinde, yukarıda belirtilen ölçülerden hangisinin esas tercih edildiğine dair yeknesak bir uygulamanın olduğunu söylemek mümkün görülmemektedir. Ancak Yargıtay birçok kararında bu ölçülerin hepsini sıralayarak, hekimlerin sorumluluğunu noktasında oldukça yüksek bir bekleyişin bulunduğunu ortaya koymaktadır. Gerçekten de Yargıtay’ın yeni tarihli bir kararında; “Doktor, hastanın zarar görmemesi için yalnız mesleki değil, genel hayat tecrübelerine göre herkese yüklenebilecek dikkat ve özeni göstermek zorundadır. Doktor tıbbi çalışmalarda bulunurken bazı mesleki şartları yerine getirmek hastanın durumuna değer vermek, tıp biliminin kurallarını gözetip uygulamak tedaviyi her türlü ihtiyat tedbirlerini alarak yapmak zorundadır. Doktor ufak bir tereddüt gösteren durumlarda bu tereddüdü ortadan kaldıracak araştırmalar yapmak ve orada koruyucu tedbirler almakla yükümlüdür. Çeşitli tedavi yöntemleri arasında seçim yaparken hastanın özelliklerini göz önünde tutmalı onu gereksiz risk altına sokmamalı en emin yolu tercih etmelidir” denilmekte, böylelikle hekim sorumluluğunda her üç kriterinde birlikte arandığı anlaşılmaktadır (102). Bu bağlamda Türk hukukunda hekimlerin tıbbi uygulamalar açısından uymak durumunda oldukları asgari standartların seviyesinin oldukça yüksek olduğunu söylemek yerinde olacaktır. Hasta Hakları Yönetmeliği’nin “tıbbi gereklere uygun teşhis, tedavi ve bakım” başlıklı 11. madde hükmü de bu anlayışı destekler mahiyettedir (108).

Tıbbi alanda pek çok uygulama hataları ile karşılaşmak olasıdır. Short' a göre hekimler erken tanı, teşhis ve tedavi aşamalarında kusurlu davranabilmektedirler (109).

Tıbbi uygulamalar söz konusu olduğunda kusurlu davranışlar ve yapılan hatalar sonucunda meydana gelen zararın az ya da çok, önemli ya da önemsiz olarak sınıflandırılması doğru değildir. Zira sonuçta tüm zararlar insan sağlığı üzerinde meydana gelen olumsuz sonuçlardır. Malpraktis nadiren tek bir nedene bağlı olarak meydana gelebilmektedir. Genellikle insan (bilgisizlik, zihinsel muhakeme hataları, dikkatsizlik gibi), çevresel faktörler ve tıbbi cihazlar gibi malpraktis oluşması riskini arttıran çeşitli faktörler mevcuttur (87, 110).

İnsana bağlı ve Malpraktisin oluşmasına sebebiyet verecek faktörler şöylece sıralanabilir. Bu faktörlerin belkide en önemlisi tecrübe ve eğitim eksikliğidir. Bilgisizlikten ve deneyimsizlikten kaynaklanan hataların sayısı azımsanmayacak ölçüdedir. Bilgi o kadar hızlı gelişmektedir ki, hekimler kendi uzmanlık alanındaki tüm bilgilere dahi hakim olamayabilmektedir. Herhangi bir hastalığa müdahale edebilmek için belirli bir tecrübe gerekmektedir. Aksi takdirde tecrübesiz kadrolar ve yetersiz denetim sonucunda malpraktis vakalarının artabileceği belirtilmektedir (111). Yeterli mesleki bilgi ile donatılmamış sağlık personeli, sadece malpraktis vakalarının artmasına yol açmayıp, aynı zamanda ilgili diğer personelin eğitilme olanağını da ortadan kaldırmaktadır. Hekimlerin, fiziki yorgunluğu ve dikkat azlığı da malpraktiste önemli bir faktör olmaktadır. Hastaların şikayetlerinin yeterince dinlenmediği durumlarda, önemli hususlar atlanabilmekte ve yanlış değerlendirme nedeniyle hatalı kararlar alınabilmektedir. Bu durum, doğru bir teşhisin ancak fizik muayene ve yeterli iletişime bağlı olduğu göstermektedir. Malpraktisi doğuran sebeplerden biri de hekimin sağlık bakımı görevinin hastaya zarar verilmesi ile sonuçlanacak şekilde ihlal edilmesidir. Olumsuz çevre şartları, personelin konsantrasyon süresini etkilemekte ve sonuçta daha hızlı karar verme yolu seçilmektedir. Uygun olmayan

ve yetersiz veya eksik tıbbi cihazlar da vasat bir klinik performansa neden olmakta ve malpraktis oluşum riskini artırmaktadır.

Malpraktisin oluşma nedenlerini böylece sıraladıktan sonra tıbbi uygulamalar açısından tanı ve tedavi aşamalarında karşılaşılan ve malpraktis olarak tanımlanabilecek durumlar aşağıda açıklanmaktadır

2. 4. 1. Tanıda Karşılaşılan Sorunlar

Hastanın hekimden ilk beklentisi, hastalığının tanısını doğru olarak koyması olacaktır. Bunun için birtakım muayenelerin, tetkiklerin yapılması ve sonra bunların değerlendirilmesi gerekecektir. Hastaya, hastalığın prognozu ile ilgili beklentiler uygun şekilde açıklanmalı ve ilave beklentiler daha sonra oluşabilecek hasta kritiklerini azaltmaya yardımcı olacak şekilde belirtilmelidir. Bütün bulguların detaylı olarak dökümantasyonu ve hasta ile iletişim, hastanın hastalığının her aşamasında ve her karar noktasında zorunlu olmaktadır. Hastayı, belirli ve kararlaştırılan bir zamanda veya belirli ve kararlaştırılan bulgu ve semptomların ortaya çıkması halinde tekrar hekime müracaat etmesi için teşvik etmek, hayati önem taşımaktadır. Hastanın şikayetleri doğrultusunda yapılan muayenenin yeterli, elde edilen muayene bulgularının doğru olması gerekir. Bunlardan elde edilen sonuçlara göre birtakım tetkikler istenecekse, yine amaç doğrultusunda istenen tetkiklerin yeterli olması gereklidir. Aksi halde eksik araştırma yapılmış olur ve kusurlu bir davranış ortaya çıkar. Son aşamada sıra ile elde edilen bulguların ve tetkiklerin değerlendirilmesine gelecektir. Bu aşamada da yanlış değerlendirmeler yapılması söz konusu olabilir. Dolayısı ile tanı konamayabilir veya yanlış tanı konabilir. Hekimden beklenen dikkat, bilgi ve becerisini göstermesidir. Burada unutulmaması gereken nokta, bu işlemlerin her aşamasında hastanın bilgilendirilmesinin gerektiğidir. Hangi tetkiklerin ne amaçla yapıldığı ve ne sonuçlar elde edildiği, anlayacağı biçimde kendisine anlatılmalıdır. Hekimin hastaya uygulayacağı tedavi ve ameliyat hakkında bilgi vermesi ve iznini alması zorunludur. Tanı

aşamasında kusur olarak nitelendirilebilecek diğer bir husus, gerekli olan konsültasyonların istenmemiş olmasıdır. Bu durum eksik araştırma olarak kabul edilebileceği gibi, özen kusuru olarak da kabul edilebilir (112, 113).

2. 4. 2. Tedavide Karşılaşılan Sorunlar

Tanı ve Teşhisin doğruluğu uygun bir tedavinin yapılabilmesinin ön şartıdır. Dolayısı ile tanıda hataya düşülmesi, başka bir deyişle doğru tanının konamaması halinde tedavi de aksayacaktır. Bunun dışında tedavi aşamasında da kusurlu davranışlar sebebiyle hataların oluşması ve hastanın zarar görmesi mümkündür. Hekimler tanısı konulan hastalığın tedavisi için en risksiz ve hasta açısından en güvenilir tedavi yöntemini seçmekle yükümlüdürler. Bu anlamda cerrahi bir müdahale gerekip gerekmediği uygulanacak ilaç kombinasyonlarının seçimi vb. gibi tedavi alternatiflerinden hangisinin tıp bilimi açısından en doğru ve güvenilir olduğuna hekim karar vermeli ve hastasına bu kararı bildirmelidir. Bu aşamadan sonra çeşitli alternatifler arasında hangisinin tercih edileceğine hekim ile hasta birlikte karar verecektir. Hekimin tedaviye ilişkin sorumluluğu sadece hangi tedavi yönteminin uygulanacağını tespit etmekle bitmemekte, tedavinin gereklerinin yerine getirilmesi hastanın ve hastalığın takibi tedavi sırasında ortaya çıkabilecek olumsuz durumların değerlendirilmesi ve giderilmesi de tedavi sorumluluğu kapsamında değerlendirilmektedir. Bu sorumluluklara aykırı davranılması ya da ihmal gösterilmesi durumunda ise tedaviye ilişkin kusurlu uygulamalar, yani malpraktis gelişmektedir. Tıbbi uygulamalarda, tanı ve tedavinin doğru olarak gerçekleştirilmesinden asıl sorumlu olan kişi hastayı takip eden hekimdir. Ancak bilindiği üzere bu ameliyeler hekime yardımcı olan, sağlık görevlileri bulunmaktadır. Bu kişiler hekim tarafından verilen ve tespit edilen talimatlar doğrultusunda hareket ettiğinden, onların kusurlarından kaynaklanan zararlarda dahi hekimin sorumlu kabul edildiği bilinmektedir.

Gerek tanı/teşhis aşamasında gerekse de tedavi aşamasında ortaya çıkan ve hastanın zarar görmesine sebebiyet veren kusurlu tıp uygulamaları nedeniyle, hekimlerin hukuk önünde de sorumlulukları doğmaktadır. Bu bağlamda, hekim tarafından gerçekleştirilen eylem ya da yapılan ihmalin, ceza kanunları gereğinde suç oluşturması durumunda hekimin cezai sorumluluğu, aynı zamanda hastanın zararını gidermeye yönelik olarak da tazminat sorumluluğu söz konusudur.

Hekimin hasta ile ilişkisi hukuken genellikle bir tür vekalet tipi sözleşme olarak kabul edilir. Hekim vekil, hasta müvekkil durumundadır. Buna göre, hekimin hastasına iyileşeceğine dair güvence verme yükümlülüğü yoktur. Hekimlik mesleği hukukçular tarafından da kabul edildiği üzere riskli bir meslektir. Günümüz hukuk anlayışında, hekimler ve diğer sağlık personeli çalışmalarını izin verilen risk kavramı çerçevesinde yerine getirirler. Her tıbbi girişimin, tıbbın kabul ettiği normal risk ve sapmaları çerçevesinde doğabilecek kötü sonuçları hekimi sorumlu kılmaz. Ancak tıbbi yardımın özenle yürütülmesi zorunluluğu (özen borcu) vardır.

Beklenen özen ise hiç kuşkusuz ilgili sağlık biriminin tıbbi olanakları ve tıbbi girişimin tehlikelilik derecesi ile orantılıdır. Hekim ve diğer sağlık personeli çalıştığı birimin olanakları ölçüsünde gerekli önlemleri önceden almalı, zorunlu haller dışında riskli tedavilerden kaçınmalıdır. Hekimin sorumluluğu özen borcunu yerine getirirken gösterilecek bir savsaklama nedeniyle gündeme gelebilecektir.

Hekimin cezai sorumluluğu TCK'nda ayrıca düzenlenmemiş muayene ve tedavi sırasında hata yapma, hastaya zarar verme veya ölümüne sebep olma şeklindeki kusurlar TCK'nun 85 ve 89. maddeleri kapsamında değerlendirilmektedir. Buna göre hekim, tıbbi uygulamalar sırasında taksirle hastanın ölümüne yahut yaralanmasına ve zarar görmesine sebebiyet verir ise, hakkında cezai takibat yapılabilecektir. Taksirli davranışın ne olduğu ise, TCK'nun 22. maddesinde tanımlanmıştır. Maddedeki tanıma göre taksir; “dikkat ve

özen yükümlülüğüne aykırılık dolayısıyla, bir davranışın suçun kanuni tanımında belirtilen neticesi öngörülmeyle gerçekleştirilmesidir.”

Hekim ve diğer sağlık mensuplarının kusurunun saptanmasında mahkemeler bilirkişi olarak esas olarak Yüksek Sağlık Şurası'na (YSŞ) başvururlar. YSŞ hekimlerin mesleğe ilişkin kusur ve durumlarını belirlemeye yetkilidir. Sağlık Bakanlığı içinde bulunan YSŞ hekimlik mesleğinde tanınmış bilim adamları arasından seçilen dokuz asli üyeden oluşur. Ayrıca bakanlık müsteşarı, danışma ve inceleme kurulu başkanı, sağlık işleri genel müdürleri şuranın tabii üyeleridir. Ancak, mahkemeler çehrede sabit eser, uzuv tatili gibi bazı konularda Adli Tıp Kurumu'na, başvurabilirler (Yargıtay kararı). Ancak burada hekimlerce de bilinmesi gereken temel bir husus, mahkemeler karar verirken bilirkişinin kanaatine bağlı kalmak zorunda değildir. Adli Tıp Kurumu, mahkemeler ile hakimlikler ve savcılıklar tarafından gönderilen Adli Tıp ile ilgili konularda bilimsel ve teknik görüşlerini bildirmekle yükümlü otoritedir (Adli Tıp Kurumu Kanunu, 1982; 1).

Türk Tabipleri Birliği ise, hekimler arasında mesleki deontolojiyi ve dayanışmayı korumak, hekimliğin kamu ve kişi yararına uygulanıp geliştirilmesini sağlamak ve meslek mensuplarının hak ve yararlarını korumak amacıyla kurulmuş kamu kurumu niteliğinde mesleki bir kuruluş olup, Haysiyet Divanı aracılığı ile odaya girmeyen veya kanunun kendisini görevlendirdiği diğer görevlerini yerine getirmeyen üyeleri hakkında ceza vermekle görevlidir (Türk Tabipleri Birliği Kanunu, 1953; 1) (114, 115, 116, 117).

2. 4. 3. Tıbbi Uygulama Hataları ve Bilirkişilik

Tıbbi uygulama hatası iddiaları, son yıllarda basın-yayın organlarında giderek artan oranda gündeme gelmekte ve toplumun ilgisini çekmektedir. Sağlık sistemindeki aksaklıkların kamuoyunda yarattığı hoşnutsuzluk, hukuk sistemimizdeki yetersizlikler, medyanın ilgisinin başlıca nedenleridir. Bilimsel verilere dayanmayan, dolayısı ile bilgilendirme sorumluluğunu da yerine getirmeyen bu yayınlar; hekimlerin yeteneği, bilgisi, davranışı ve

hastaya yaklaşımını sorgulayan olumsuz tutumu ile hastaları hekimlere karşı dava açmaya yönlendirmektedir.

Bazı sağlık personelinin de hasta haklarına bilerek veya bilmeyerek gösterdikleri umursamazlık, tıbbi uygulamalar sonrasında birçok sağlık personelinin gereksizce suçlanmasına zemin hazırlamaktadır. Bilirkişilik kurumlarına hasta haklarını ihlal etmek iddiası ile yapılan başvurularda, son yıllarda görülen artış önceki yılların birkaç misli rakamlara ulaşmıştır. Bu sonuç 1998 yılında yayınlanan Hasta Hakları Yönetmeliği'nin daha etkin anlaşması ve kullanılmasının yanı sıra; hasta hekim ilişkisinin değişen yüzü sağlık politikalarındaki değişimden kaynaklanan olumsuzluklar ve bu olumsuzluklardan artan oranlarda hekimlerin sorumlu tutulması ile uyumlu görünmektedir.

Sağlık hizmetlerinin sunumu sırasında yaşanan aksaklıklar nedeni ile son yıllarda daha kalıcı ve hızlı çözümler araştırılmaktadır. Hata yapan sağlık personelinin daha etkin değerlendirilmesi için bir takım yasal düzenlemeler yapılmış ve yeni önlemler de gündeme gelmiştir. Hasta hakları yönetmeliği ile hastaların hakları korunurken, sağlık personeli ile ilgili düzenlemeler çok gerilerde kalmıştır. Mevcut müphem düzenlemelerde olduğu gibi yeni ve ağırlaştırılan koşulların, açılan birçok davada hekimlerin ceza ve tazminat sorumluluğu ile karşı karşıya kalması sonucunu doğuracağı öngörülebilmektedir. Mevcut koşullarda, Türkiye'de hiçbir doktor kendini malpraktis davalarının uzağında göremez.

Tıbbi malpraktis davalarında ihmal iddialarının arkasında genellikle uygunsuz tıbbi tedavinin yaralanmaya yol açtığı kanaati bulunmaktadır. Mahkemelerde bilirkişi görüşleri gerçekleri bulmak için uğraşan mahkeme heyetine büyük kolaylık sağlar. Bilirkişiler kendi ifadeleriyle dünyada kabul gören bilimsel gerçekleri mahkeme heyetine sunarlar. Örneğin bir meteoroloji uzmanı gece gerçekleşen hırsızlık olaylarıyla ayın safhaları arasında bağlantı olup olmadığı hakkında görüş sunarken bir balistik uzmanı ise atış mesafesi ya da atışın yönü hakkında bilgi verir. Benzer şekilde tıp doktorları da kendi uzmanlık

alanlarında, tıbbi bilimlerde veya klinik aşamalar hakkında görüşlerini mahkeme heyetine sunarlar. Tıbbi malpraktis davalarında en fazla karşımıza çıkan dava sebepleri ya uzmanın olay hakkında ihmalde bulunduğu iddiası ya da hastalara gerekli tedaviyi vermemesi üzerinedir. Tıbbi bilirkişiler hastalar üzerinde meydana gelen travmaları veya aile fertlerinin iddialarını mahkemelerde anlaşılabilir şikayetlere çevirirler.

Hukuk ve ceza yargılaması kanunlarının bilirkişilik sistemindeki temel dayanak noktası, hakimin özel ya da teknik bir bilgiyi gerektiren konuda bir bilirkişiye başvurup bu konuda kendisini aydınlatmak istemesidir. Ancak hakim, bilirkişinin verdiği rapor ile bağlı değildir. Böyle durumlarda raporun kabul görmemesi gerekçesi ile açıklanmak zorundadır.

17.12.2004, tarih ve 25673 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan 5271 Kanun Numaralı yeni Ceza Muhakemesi Kanunu, bilirkişinin atanmasını (MADDE 63), aşağıdaki gibi açıklamıştır. Çözümü uzmanlığı, özel veya teknik bilgiyi gerektiren hallerde bilirkişinin oy ve görüşünün alınmasına re'sen, Cumhuriyet savcısının, katılanın, vekilinin, şüphelinin veya sanığın, müdafiinin veya kanuni temsilcinin istemi üzerine karar verilebilir. Ancak hakimlik mesleğinin gerektirdiği genel ve hukuki bilgi ile çözülmesi olanaklı konularda bilirkişi dinlenemez.

Bilirkişi atanması ve gerekçe gösterilerek sayısının birden çok olarak saptanması, hakim veya mahkemeye aittir. Birden çok bilirkişi atanmasına ilişkin istemler reddedildiğinde de aynı biçimde karar verilir. Soruşturma evresinde Cumhuriyet savcısı da bu maddede gösterilen yetkileri kullanabilir. Aynı kanunda bilirkişi olarak atanabileceklerle (MADDE 64), ilgili aşağıda sunulan yeni değişiklikler de belirtilmiştir. Bilirkişiler, il adli yargı adalet komisyonları tarafından her yıl düzenlenen bir listede yer alan gerçek veya tüzel kişiler arasından seçilir. Cumhuriyet savcıları ve hakimler yalnız bulundukları il bakımından yapılmış listelerden değil, diğer illerde oluşturulmuş listelerden de bilirkişi seçebilir. Bu

listelerin düzenlenmesine veya listelerde yer verilenlerin çıkarılmalarına ilişkin esas ve usuller, yönetmelikte gösterilir.

Önceki kanunda da engel bir durum olmamakla birlikte yeni kanunda altı çizilen bir husus, duruşmada bilirkişinin, açıklaması (MADDE 68) ile ilgili değişikliktir. Mahkeme, her zaman bilirkişinin duruşmada dinlenmesine karar verebileceği gibi, ilgililerden birinin (Cumhuriyet savcısının, katılanın, vekilinin, şüphelinin veya sanığın, müdafinin veya kanuni temsilcinin) istenmesi halinde de açıklamalarda bulunmak üzere duruşmaya çağırabilir. Bu madde ile yargı sisteminde önemli bir yere sahip “çapraz sorgu” olarak adlandırılan, bilirkişinin mahkemede tanıklığına başvurulmasının, önümüzdeki günlerde çok sık olarak gündeme geleceği öngörülmektedir. Adil yargılama kapsamında kanıtların çok daha ayrıntılı ve objektif değerlendirilme olasılığı bulunan bu sistem, bilirkişiler için de zorlu bir sınav niteliğinde olacaktır (112, 118,119, 120, 121, 122).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Materyal

3. 1. 1. Çalışma Alanı

Çalışma kapsamına alınan hastalar İstanbul ve değişik illerden VL şüphesi ile buradaki üniversite, devlet, SSK eğitim ve araştırma hastanesi gibi değişik hastanelere başvuran olgulardan seçilmiştir.

3. 1. 2. Hasta grupları

İncelemeye alınan hastalar tanı ve tedavi konulmak amacıyla, yine bu hastanelerin çocuk, hematoloji, enfeksiyon v.b. gibi kliniklerinde, çeşitli klinik tablo ile yatan ve bir çok tetkikten sonra leishmaniasis düşünülen yada tanı konulamayan asemptomatik 59 hastadan oluşmaktadır.

3. 1. 3. Materyal Alma

Çalışmamız Nisan 2002 ile Nisan 2006 tarihleri arasında leishmaniasis şüphesi ile İstanbul'da değişik hastanelerin kliniklerde yatan hastaların takibini yapan hekimlerin laboratuvarımıza başvurması ile materyal alma istekleri değerlendirilmiştir. Hasta başında bu konuda uzman klinisyenlerin ve yardımcılarının ortak müdahalesi ile uygun ortamda ve koşullarda hastalardan kemik iliği ve kan örnekleri alınmıştır.

Alınan kemik iliği aspirasyon örnekleri uygun mikrobiyolojik ekim yöntemleri ile önce steril şartlarda 3-5 adet NNN besiyerine ekimleri yapıldı. Direkt yayma ve kalın damla preparatları hazırlandı. Daha sonra steril ependrof tüplerine 200 µl kemik iliği konuldu. Hastalardan alınan 5 ml kan örnekleri 3000 devirde santrifüj edildikten sonra serolojik çalışmalar için serum örnekleri ayrıldı.

3.1.4. Laboratuar Çalışmaları

İstanbul'da değişik hastanelere giderek direkt olarak hasta başında alınan klinik örnekleri hızlı ve güvenilir bir şekilde laboratuvarımıza ulaştırıldı. Çalışmaların büyük çoğunluğunu

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Sadece bu örneklerin bir kısmını moleküler tanı ve PCR çalışmalarını Berlin'deki Humboldt Üniversitesi Robert Koch Charite Hijyen ve Mikrobiyoloji Enstitüsü Moleküler Parazitoloji Bölümünde incelendi (Resim 2).



Resim 2 : Charite Mikrobiyoloji ve Hijyen Enstitüsü Moleküler Parazitoloji Bölümünde yapılan PCR çalışmalarından görüntüler.

3.2. Tanı ve Ayırım Yöntemleri

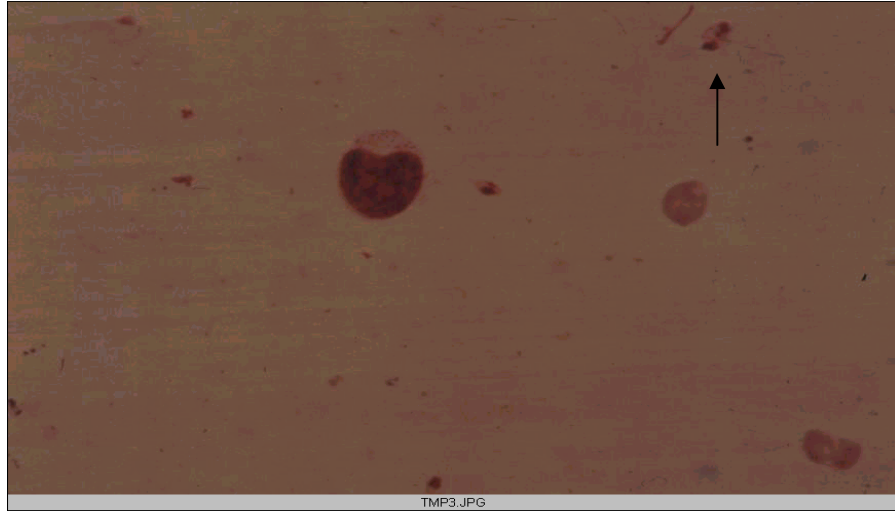
3.2.1. Direkt ve Kültür

Hasta başında alınan kemik iliği aspirasyonundan hazırladığımız yayma preparatlar Giemsa ile boyanıp mikroskopta 10X100 immersiyon objektifinde incelenmiştir. Duyarlılığı arttırmak için iki farklı araştırmacı tarafından değerlendirilmiştir.

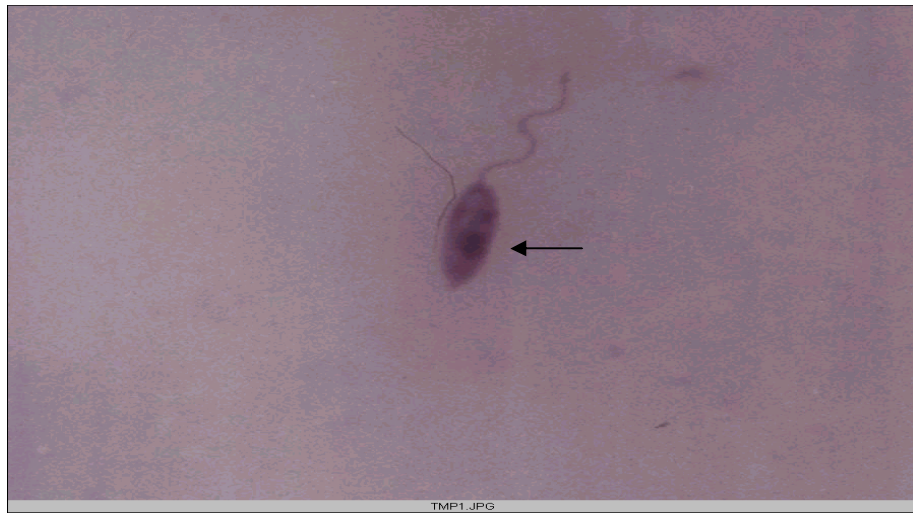
Kültür için hastalardan alınan kemik iliği ponksiyon materyaller için en uygun besiyeri olan N.N.N. besiyerine steril Pasteur pipeti ile yoğunlaşma sıvısına ekildi. Daha sonra 23–25

°C’de 21-30 gün inkübe edildi. Bakteri üremesini önlemek için ekim yapmadan önce besiyerine 200 IU/ml Penicilline, 2 µg/ml Streptomycine eklendi.

Ekimden 3-5 gün sonra yoğunlaşma sıvısından steril bir enjektör ya da steril Pasteur pipeti ile alınan sıvıdan lam - lamel arası hazırlanan preparatlarda mikroskopta leishmania’nın promastigot şekilleri arandı. Promastigot şekillerin görülmesi pozitif olarak kabul edildi. Bu işlem 7 gün ara ile tekrar edildi. 21 -30 gün sonra hazırlanan preparatlarda leishmania promastigot şekilleri görülmeyen kültürler negatif olarak değerlendirildi (Resim 3, 4).



Resim 3 : Kemik iliğinde leishmania’nın amastigot şekli (Giemsa 10X100).



Resim 4: N.N.N besiyerinde üreyen leishmania’nın promastigot şekli(Giemsa 10X100).

3. 2. 2. Serolojik Testler (ELISA, IFAT, Formol-Jel)

Serum örneklerinde; Formol-Jel, ELISA Ig G (*Leishmania* Ab R- Biopharm, Germany) ve IFAT (kendi hazırladığımız *Leishmania infantum*) ile *leishmania* antikorları araştırıldı. Ayrıca kemik iliği örnekleri ve kalın damla preparatları PCR çalışılması için saklandı. N.N.N. besiyeri oda (23-25 °C) sıcaklığında tutularak haftada bir lam-lamel arası preparat hazırlanarak *leishmania*'nın üreyip üremediğine bakıldı.

Formol-Jel

İki tüp alınır, bunların her birine 1 ml saydam serum konur. Bunlardan birine % 40'lık formalinden 1 veya 2 damla damlatılır. Serum hemen çalkalanır ve iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 24 saat kendi haline bırakılır. Serum kaynamış yumurta akı gibi katılaşır ve aynı zamanda saydamlığını da yitirerek opaklaşırsa deney pozitif olarak kabul edilir. Kuvvetli reaksiyonlarda birkaç dakika içinde serum kaynamış yumurta akı gibi katılaşır ve aynı zamanda saydamlığını da yitirerek opaklaşır. Deneyde önemli olan opaklaşmasıdır. Eğer serum katılaşır şeffaf kalırsa sonuç negatif olarak kabul edilir. Sonuçlar, içine formalin konmamış tüpdeki serumla karşılaştırılır.

IFAT (İndirekt Floresans Antikor Testi)

Besiyerinin sıvı kısmı ile birlikte alınanan promastigotlar pH 7.6 olan fosfat tamponu ile 3-5 kez 1500-2000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Promastigotlar 1 ml fosfat tamponunda 10^3 ya da 10^5 olacak şekilde sulandırıldı. Bu sulandırmadan bir kılavuz lam aracılığı ile alkol- eter ile temizlenmiş lamlar üzerine steril Pasteur pipeti ile bir damla konuldu ve oda sıcaklığında kendi haline kurumaya bırakıldı (Şekil 4).

O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O

Şekil 4 : IFAT'ta kullanılan kılavuz lam

Kuruyan lamalar içinde silikajel ya da başka bir su çeken madde bulunan plastik kutu ya da torbalar içine konarak - 50 °C'lik derin dondurucuda 6 ay kadar saklandı.

Deney yapılacağı zaman antijen kaplı lamalar derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi için bir süre bekletildi. Çalışılacak hasta serumu, pozitif ve negatif serum örnekleri fosfat tamponu ile 1/16, 1/64, 1/128 ve 1/256 oranında sulandırıldı. Sulandırılan serum örneklerinden 0.025 ml antijen üzerine konuldu ve içinde nemli süzgeç kağıdı bulunan petri kutuları içinde 37°C'lik etüvde 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra lamalar üzerindeki serumlar döküldü ve Pasteur pipeti yardımıyla fosfat tamponu ile hafifçe yıkanarak suyu giderildi. Daha sonra lamaların üzerine fluorescein isothiocyanate ile işaretli anti-insan globulinleri FITC (Florescein Isothiocyanate) işaretli Anti-human polivalan İmmünoglobulin(IgA, IgG, IgM) Konjugatın (Sigma-Biosciences-USA) 1/128 oranında sulandırılarak konuldu. İçinde nemli süzgeç kağıdı bulunan petri kutuları içinde 37 °C'lik etüvde 30 dakika inkübe edildi. Etüvden çıkarılan lamaların üzerindeki sıvı döküldü ve

Pasteur pipeti yardımıyla fosfat tamponu ile hafifçe yıkanarak suyu giderildi. Lamların üzerine kurumadan serum fizyolojikle 1/9 oranında sulandırılmış gliserinden bir damla konuldu ve lamel kapatıldı. Bu şekilde hazırlanan preparatlar floresan mikroskopunda incelendi ve sonuçlar kayıt edildi. Pozitif vakalarda leptomonasların özellikle çevreleri ve kinetoplastın bulunduğu kısım parlak sarı yeşil renkte görülür. Leptomonasın sitoplazması ise çevreden biraz daha az parlak sarı yeşil renge boyanmaktadır. Negatif vakalarda, leptomonaslar uçuk soluk yeşil renkte görülmektedir.

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

VL şüpheli hastalardan alınan düz kan örneklerine ait ayrılan serumlar ticari olarak piyasada bulunan ELISA (RIDASCREEN® Leishmania Ab r - biopharm, Germany) kiti kullanım kılavuzuna uygun olarak laboratuvarında çalışılmıştır. Çalışmamızı uygularken ilk basamakta 10 µl alınan hasta serumunu 190 µl buffer ile sulandırarak 1: 20 dilüsyon hazırlandı. A1' e blank negatif kontrol, A2'ye kalibratör, A3'e pozitif kontrol ve sonra sırasıyla devam eden kuyucuklara hasta örneklerinden 100'er µl ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 5 kez 300 µl yıkama sıvısı ile kuyucuklar yıkanarak kurutma kağıdı ile kurutuldu. İkinci aşamada 100 µl anti-human IgG-konjugate damlatılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Tekrar 5 kez 300 µl yıkama sıvısı ile yıkama yapıldı. Üçüncü aşamada kuyucukların üzerine 50 µl substrat ve kromogen ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletildi. Son olarak yine 50 µl stop solüsyonu damlatılarak 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutularak sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen absorbans değerleri kalibratör kontrolün absorbans değerine bölündü.

Sonuçların değerlendirilmesi $< 0.9 \rightarrow$ Negatif

$0.9 - 1.1 \rightarrow$ Deney tekrar edilmeli

$> 1.1 \rightarrow$ Pozitif olarak kabul edildi.

Örnek

----- =.....ISR(Immun Status Ratio) olarak belirlendi.

Kalibratör

3. 2. 3. PCR

Hastalardan almış olduğumuz kemik iliği aspirasyon örneklerinin bir kısmı ependerof tüplerine konuldu ve bir kısmından da kalın damla preparatları hazırlandı. Hazırlanan bu örnekler çalışılmak üzere Berlin Charite Robert Koch Mikrobiyoloji ve Hijyen Enstitüsü Moleküler Parazitoloji Bölümü laboratuvarına götürülerek PCR yöntemi ile çalışıldı.

3.2.3.1. Klinik Örneklerden DNA Ekstraksiyon

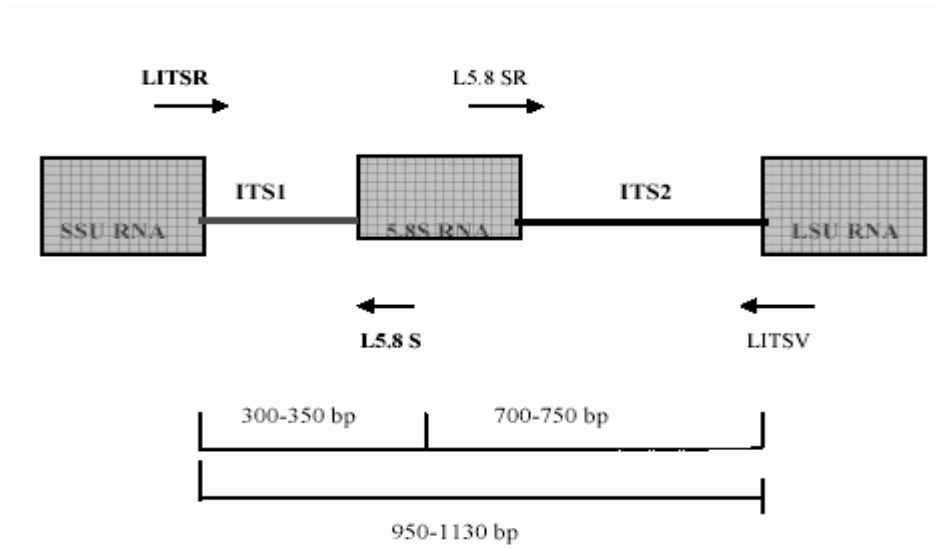
Hastalardan alınan kemik iliği örneklerinin DNA ekstraksiyonlarının yapılacağı laboratuara çalışılmak üzere götürüldü (Resim: 2). Prepratlar önce üzerlerine 250 µl lysis buffer (50 µl, 100µl, 100 µl şeklinde bir kaç kez) konarak kısa bir süre örneğin yumuşaması için beklendi. Bir spatula yardımıyla lam üzerindeki örnekler dikkatlice hazırlanan 1.5 ml'lik yeni bir ependorf içine konuldu. Üzerine 2.5 µl Triton X-100 yavaşça bir kenardan otomatik pipetle ilave edildi. Üzerine tekrar 2.5 µl Proteinase K koyarak 1 gece 60°C de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün fenol-kloroform ekstraksiyonu işlemine başlandı. Bir gece bekletilen örneklerin her birine diagnostik fenol 1 volume (250 µl olacak biçimde konularak iki parmak arasında 3 dakika yavaş bir biçimde sağa-sola çevirerek bir karışım sağlandı, opak süt biçiminde bir kıvam) konuldu. Daha sonra 13 000 rpm'de ependorf santrifüjde 3 dakika çevrildi. Bu işlem sonucunda ependorf içersinde oluşan iki farklı fazdan üst kısımda bulunanı dikkatli bir biçimde alarak yeni 1.5 ml'lik ependorf içine konuldu. Ayırdığımız örneklerin üzerine fenol: kloroform: isoamilalkol (25:24:1) 1 volume eşit olacak şekilde koyarak yukarıda anlatıldığı şekilde elle çevirme ve santrifüj işlemlere

tabii tutuldu. Tekrar oluşan fazdan üst faz yeni ependroflara ayrılarak üzerine kloroform-isoamilalkol (24:1) eşit olacak şekilde konuldu. Parmak ucunda çevirme ve santrifüjlemeden sonra ortaya yukarıdaki gibi yine iki faz elde edildi. Üst fazları dikkatli bir biçimde tekrar ayrı bir ependorfa boşaltıldı. Ayrılan bu örneğin üzerine 1/10 3M Na Asetat ve toplam hacminin iki katı kadar % 96'lık etanol ilave ederek -20°C 'de bir gece beklemeye bırakıldı. Daha sonra örnekler 30 dakika 13 000 rpm'de çevrildi. Bu aşamada DNA pelletleri dibe çöktü. Bir kez daha üst faz tekrar ayrılarak dışarı atıldı. % 70'lik etanol (400 µl, 600 µl yada 1 ml olabilir), ile ependroflar 15 dakika 13 000 rpm'de tekrar santrifüj edildi. İşleme tabi olan örneklerimizin üzerindeki etanol dikkatlice dışarı atıldı. Ependrofların dip kısmında ya da kenarlarına yapışmış DNA pelletleri artık dışarıdan gözle fark edilecek şekil almıştır. Kapakları açık bir şekilde vakum yapılarak kurutulmak üzere dry-speed'te 7-10 dakika vakum yapıldı. Tamamen kuruyup etanol'ün buharlaşması sağlanan örnekler üzerine 100 µl TE buffer konuldu. Daha sonra DNA pürifikasyonu yapılması için ticari olarak satın alınan hazır kit ile (Nucleospin, Machary- Nagel, Düren-Germany) pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Pürifikasyon yapılmış yaklaşık 30 µl DNA örnekleri PCR'da kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3. 2. 3. 2. PCR Amplifikasyon: ITS1 (Internal Transcribed Spacer)

PCR için kullanılan reaktifler ve daha önce elde edilen DNA ekstraksiyon ürünü olan pelletler tekrar ön hazırlıkları yapılmış PCR odasına (Resim: 2) alındı. Amplifikasyonda sırasıyla kullanılacak maddeler; 10X PCR Buffer, dNTP bazları (Amersham Biosciences, UK limited. England), Taq Polimeraz enzimi (Applied Biosystems, Roche, USA), steril su, Primerler LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3')/L5.8S (5'-TGATACTTATCGCACTT-3') ITS1 (Internal Transcribed Spacer) ssu rRNA ve 5.8S, rRNA (300-350 bp) ve DMSO (% 2.5 dimethyl-sulfoxyd) hazırlandı. Analizde

seçilen hedef bölgede kullanılacak primerler tüm leishmania türleri için ticari olarak sentez edilmişlerdir (TIB-MOLBIOL, Berlin, Germany) (Şekil: 5) (78).



Şekil 5: Primer olarak kullanılan ITS (Internal Transcribed Spacer)’in şematik diyagramı (SSU = Küçük alt birim rRNA geni, LSU = Büyük alt birim rRNA geni)

Tablo 1: PCR çalışılacak bir örnek için hazırlanan karışıma (Master Mix: MM) konulacak maddeler ve miktarları

ITS1-PCR			
No	Maddeler	µl	Final konsantrasyon
1	10 x PCR Buffer	5	1x 5
2	dNTPs, 2.5mM (10mM)	4	200µ M
3	Primer, Forward, 10 pmol/µl	2.5	25 pmol
4	Primer, Reverse, 10 pmol/µl	2.5	25 pmol
5	DMSO	1.25	% 2.5
6	Taq Polymerase, 5 ünite / µl	0.2	1 ünite/µl
7	H ₂ O	32.55	
Toplam karışım		47	
Örnek DNA		3	
Toplam		50	
1 X Buffer içine 1.5 mM MgCl ₂ konularak PCR Buffer elde edildi			

PCR’da kullanılacak tüm bu maddelerden başlangıç olarak 1.5 ml’lik steril bir tüp içinde Master Mix (MM) hazırlandı (Tablo:1) Kaç örnek çalışılacak ise o miktarda ve de pozitif, negatif örnekleri de içerecek biçimde her bir örnek için hazırlanan 47 µl MM önce vortekslendi. Daha sonra küçük mikrotüplere dikkatli ve uygun şekilde dağıtıldı. Üzerlerinede 3 µl DNA örneklerinden konuldu. Pozitif örnek için *Leishmania turanica* (MRHO/MN/83/MNR-6), Negatif örnek için steril su (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) kullanıldı (Tablo :2).

Tablo 2: PCR’da; hazırlanan karışım (MM), DNA örnekleri, pozitif ve negatif kontrollerin miktarları

	Örnek	Pozitif örnek <i>L.turanica</i>	Pozitif kontrol (<i>L.turanica</i> *)	Negatif Kontrol (H2O)
MM	47 µl	47µl	47µl	47µl
DNA örnekleri	3µl	3µl		
<i>L.turanica</i>		2µl	2µl	
Steril su				2µl

* *Leishmania turanica*’nın DNA konsantrasyonu 10ng/ µl

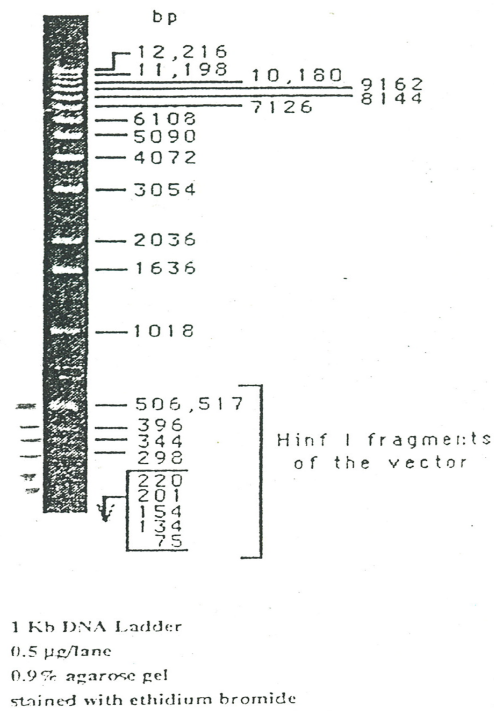
Son olarak termocyler (PCR ısıtıcı- soğutucu)’da buharlaşma ve de kontaminasyonu önlemek için her birinin üzerine 1 damla (50µl) mineral yağ konuldu. Küçük mikrotüplerin kapakları kapatılarak santrifüj edildi. Daha sonra tüm çalışılacak örnekler amplifiye edileceği termocyler cihazına (Perkin Emler) yerleştirilerek (Resim:2) (Tablo:3) programlandı. PCR’ da çoğaltılan örneklerle hemen çalışılabildiği gibi daha sonra yapılacak işlemler için ya 2.5 saat ya da 1 gece bekletildiği gibi -20°C’de muhafaza edildi.

Tablo 3 : PCR’da leishmania’nın çoğaltma işleminin yapılacağı ısıtma programı.

Çalışılan Bölge	Döngü sayısı	Ayrıştırma	Soğutma	Birleştirme
ITS1 –ITS2	Başlangıç döngüsü	95 °C 2 dakika	0	0
ITS1 –ITS2	32-35 döngü	95 °C 20-30 saniye	53 °C 30 saniye	72 °C 1 dakika
ITS1 –ITS2	Son döngü	0	0	72°C 6 dakika

3. 2. 3. 3. Agaroz Jel Hazırlama ve Elektroforez

Yürütülecek örnek % 1 agaroz NA (Amersham Biosciences, Sweden) ve 0.5 x TBE buffer (0.023M Tris-borate, 0.5mM EDTA), ya 15 cm jel uzunluğunda 100 V, 1 saat süre ya da 25 cm jel uzunluğunda 140 V, 1.5 saat süre ile elektroforez işlemine tabi tutarak yürütme işlemi tamamlandı. Burada agoroz jeli yürütmeden önce bir plak üzerine kaplı alüminyum folyo üzerine 3 µl loading buffer, 5µl tank buffer ve 5 µl’de amplifiye edilmiş PCR ürünlerinden oluşan bir karışım hazırlanarak dikkatli bir şekilde otomatik pipet yardımıyla kuyucuklara konuldu. Marker olarak ise 1 kbp moleküler büyüklükte (One kilo base pair) veya 123 bp moleküler büyüklükte DNA ladders (Invitrogen, Life Tech, Carlsbad CA, USA) kullanılmıştır (Şekil 6).



Şekil 6: PCR’ da Marker olarak kullanılan 1 kb DNA Ladder.

Elektroforez işleminden sonra tankın içinden jel dikkatlice çıkarılarak birkaç kez distile su ile yıkanıp ethidium bromide (0.5 µg/ml)’lü tank içinde 15 dakika bekletildi. Bekletme işlemini müteakip tekrar birkaç kez distile su ile yıkadıktan sonra amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin görüntüsünün alınacağı bilgisayarlı fotoğraf cihazı (Gene Eagle eye 11, Stratagene, Heidelberg)’nda PCR ürünleri belgelendi.

Değerlendirme kısmında ise örneklerimizin kontrollü olarak okumaları yapıp, daha önceki defter kayıtları ve dolaptaki PCR çalışmalarının sonuçları ile karşılaştırarak çalışma işlemimiz sonuçlandırılmıştır.

3. 2. 3. 4. PCR Tanısında Kullanılan Kontrol Panelleri

DNA Ekstraksiyon Kontrolü: Çalışmanın başlangıcı olan DNA ekstraksiyonun doğru yapıp yapılmadığını araştırdığımız ve PCR-ITS1’de amplifikasyon sonucunda negatif

çıkan örnekler (Başlangıçta 1.5 ml ependroflarda sakladığımız) yaptığımız bir işlemdir. Burada yapılan işlem önceki PCR'dan farklı olarak kullanılan İnsan Beta Glubulin (HBG) sorumlu genlerin amplifikasyonu şeklinde düzenlenen primerler H β G-F (5`-GAA GAG CCA AGG ACAGGT AC-3`) / H β G-R (5`-CAA CTT CAT CCA CGT TCACC-3`)’in uygulanmasıydı. Ayrıca % 2.5 dimethyl-sulfoxyd [(DMSO) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)] yerine steril su konulmuştur. Burada kullanılan örnek miktarı 3 μ l ve ürün boyutu ise 268 bp olarak belirlenmiştir (78) .

Pozitif ve negatif kontroller: Pozitif kontroller için *Leishmania turanica* (MRHO/MN/83/MNR-6)’dan elde edilen 10ng/ μ l konsantrasyonda 3 μ l DNA ve negatif kontroller için steril 2 μ l su (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) kullanıldı.

İnhibasyon Kontrolü: Çalışmamız esnasında bir takım istenmeyen maddelerin sebep olabileceği inhibasyonları tanımlamak yalnız başına yeterli değildir. Bizden kaynaklanacak istenmeyen kirlenmeleri de kontrol etmek gerekir. Bu nedenle tanımlanacak her örnek için pozitif kontrol olarak saflaştırılmış *L. turanica* (MRHO/MN/83/MNR-6), 10ng/ μ l ve buna ilave olarak % 2.5 dimethyl-sulfoxyd (DMSO) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)’li yapılacak tüm PCR işlemlerinde kullanılmıştır. Ayrıca her zaman alınması gereken; eldiven kullanma, temiz çalışma ve daima disposabl malzeme kullanımı v.b. gibi tedbirlerle kontaminasyonu önleyecek koşullar da sağlandı.

3. 2. 3. 5. Nesdet-PCR

İlk elde ettiğimiz PCR protaktlarını bir kez daha çoğaltmak daha da fazla DNA ürünü elde etmek için yaptığımız işlem küçük ependroflar içindeki ilk PCR ürünlerini yukarıda anlatılan şekilde bir karışım (Master Mix) hazırlayarak çoğaltma işlemini yeniden yapmaktır. Burada sadece, % 2.5 dimethyl-sulfoxyd (DMSO) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) yerine steril distile su konulmuştur. Kullandığımız örnek miktarı 2 μ l olarak

alındı. Yine daha önce yapıldığı biçimde önce PCR'da çoğaltıp daha sonra agaroz-jelde yürüterek ve son olarakta görüntüleri alınarak Nested-PCR işlemi sonuçlandırıldı.

3. 2. 3. 6. Restriksiyon Analiz (RA)

Amlifiye ITS1 bölgesinin restriksiyon enzimi *Hae III* (Hybaid-UK) ile tanımlanmasıdır. Burada amaç çalışmada belirtilen pozitif klinik örnekler (leishmania)'in tür tanımlamalarının yapılacağı bir analiz tekniği kullanılmasıdır. Orijinal PCR ürünleri (DNA amplifikasyon PCR) ile yine bu ürünlerin tekrar çoğaltılmış ürünleri (Nested PCR) 'nin her biri için Master-Mix (MM)'ler hazırlandı. Hazırlanan bir ependrof içine sırasıyla şu reaktifler konuldu. Restriksiyon enziminden (*Hae III*)'den 1µl (5 unite), uygun 10 X bufferdan 2 µl ve distile sudan 2 µl olacak şekilde bir karışım hazırlandı. Marker olarak ise 1 kbp (One kilo base pair) moleküler büyüklükte veya 123 bp moleküler büyüklükte (Invitrogen, Life Tech, Carlsbad CA, USA) DNA ladder kullanılmıştır. Ayrıca bu karışıma klinik örneklerden elde edilen ürünlerden ise 15 µl koyarak 37°C'de 2 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon devam ederken bir taraftanda hazırlanan restriksiyon ürünleri (5 µl Master-Mix + 15 µl PCR ürünü)'nin agaroz jelde görüntülerini almak için jel döküp hazırlandı. Yalnız burada yürütülecek miktarının fazlalığı da göz önüne alınarak ve de daha iyi görüntü almak için agar miktarı da fazla tutuldu. Tüm klinik örneklerin içine 4 µl loading buffer (%80 glycerine, 0.1M EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 8.0)'da ilave edilen ependroflar iyice karıştırılarak konuldu. Ayrıca dikkatli bir biçimde hazırlanan büyük bir jel tepsisi içine 0.5X TBE buffer (0.023M. Tris-borate, 0.5mM EDTA) ile normal agaroz (Amersham Biosciences, Sweden) dikkatli bir şekilde konuldu. Daha sonra yüklemesi biten örnekler 1.5 saat 140 V elektroforez işlemine tabi tutularak yürütme işlemi de tamamlanmış oldu. Son olarak ise DNA parçacıklarının Ultra viole ışık altında görüntülerini almak için 15 dakika ethidium bromide (0.5µg/ml) ile muamele edildi. Restriksiyon ürünlerinin görüntüsünün alınacağı bilgisayarlı fotoğraf cihazı (Gene Eagle

eye 11, Stratagene, Heidelberg)’nda bunlar belgelendi. Ayrıca değerlendirme sırasında leishmania’nın ITS1 bölgesinin restriksiyon haritasındaki sayısal değerler göz önüne alındı (Tablo: 4).

Tablo 4: ITS1 bölgesininin restriksiyon haritasındaki sayısal değerleri

Leishmania türleri								
Restriksiyon Enzimi	donavani	infantum	chagasi	aethiopica	tropica	major	turanica	mexicana
Hae III	184	184	185	200	185	203	203	186
	75	72	72	57	57	132	54	142
	54	55	55	54	53		52	
				23	24		24	

3.3. Kullanılan Malzeme ve Araç Gereçler

3.3.1. Kimyasallar ve Kitler

<u>Kimyasal Madde</u>	<u>Firma</u>
Hae III	Hybaid-UK
Primerler	TIB-MOLBIOL, Syntheselabor, Berlin
PCR kit	Gibco
TEMED (N, N, N, N tetra etilen diamin)	Fluka
Mineral yağ	Sigma
DNA marker 100 bp,123 bp, 1 kb	Invitrogen, Life Tech, Carlsbad CA,
USA	
Giemsa	Sigma

BSA (Bovin serum albümin)	Sigma
Asetik asid	Merck
Kloroform	Merck
Ethanol	Merck
Formaldehid	Merck
İsoamil alkol	Merck
Gümüş nitrat	Merck
Sodyum asetat	Merck
Metil alkol	Merck
Alkol-eter	Merck
Metilen mavisi	Merck
Leishmania Ab	Biopharma
Anti-Human Polivalan İmmünoglobilin(IgA,IgG,IgM)	
FITC (Fluorescein Isothiocyanate) Konjüгат	Sigma
Sodyum fosfat	Merck
Sodyum klorür	Merck
Sodyum dodesil sülfat	Merck
Sodyum karbonat (SDS)	Sigma
MoSieve™-Agaroz- MS500	Peqlab
Triton X-100	Sigma
Agaroz NA	AmershamBiosciences, Sweden
dNTP bazları	Amersham Biosciences, UK limited.
England	
PCR purifikasyon kit	Nucleospin, Machary- Nagel, Düren- Germany

DMSO (Dimetil sülfoksil)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
H ₂ O steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Borik asit	Roth
Gliserin	Roth
Fenol (buffered)	Roth
Foetal calf serum	Seromed
EDTA	Sigma
Ethidiyum bromid	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Proteinaz K	Sigma
Sodyum hidroksit	Sigma

Malzeme

Firma

Lam ve Lamel	
Cam eşyalar (beher, balon joje, mezür, pipet v.b.)	Technical
Santrifüj deney tüpleri	
Kapaklı tüpler 2 µl	Eppendrof
Steril filtre 0.22 µm	Millipore
Steril kültür tüpleri	Nunc
PCR için düz tüp 0.5 ml	Peqlab
Selofan	Roth
Mikrokapiller yuvarlak uçlar	Sigma
Hava geçirmeyen uçlar 0.5-10 µl	Sigma
Otomatik Pipet uçları 0.5- 10 µl	Eppendrof
10 - 100 µl	
100 -1000µl	

3.3.2. Cihazlar

<u>Cihaz</u>	<u>Firma</u>
Ependrof Santrifüj	Heraeus Sepatech Biofuge 13R
Santrifüj	Heraeus Varifuge 3.0R
Isı döngü aleti (Termocycler)	Perkin-Elmer
Spektro fotometre	Heraeus
Görüntüleme cihazı	Gene Eagle eye 11, Stratagene, Heidelberg
Elektroforez	Sartorius
Isı ayarlı çalkalayıcı	Nüve
Otomatik pipetler; 1-10 µl , 10-50 µl, 20-100 µl 50-250 µl, 250-1000 µl	Eppendorf
Otoklav	Nüve
Buzdolabı	Bosch
Derin dondurucu	Bosch
Vorteks	Heraeus
Etüv	Nüve
Pasteur fırını	Nüve
Manyetik karıştırıcı	Heraeus
Elektronik hassas terazi	Heraeus
Güç kaynağı	Biometra standard Power pack P250
Filtre	Sartorius
Vakum cihazı	Eppendorf 5301
Elektrikli ısıtıcı	Elektromag
Binoküler Mikroskop	Nikon

Floresan Mikroskop	Olimpus B x 50 x 400
Fotoğraf makinesi	Zeizz Axioskop-40
Elisa okuyucu ve yıkayıcı	Bio-Tek EL x 800 EL x 50

3. 3. 3. Standart solüsyonlar

<u>Kullanılan standart solüsyonlar</u>	<u>Miktarları</u>
10 X TBE Buffer (1 lt)	108g Tris (hidroksimetil amino metan) 55 g Borik asid 40 mg ETDA (0.5 M ; pH 8.0)
Ethidium bromide stok solüsyon(10 mg/ml)	100 µl Ethidium bromide 2 lt Distile su
TE-Buffer (200 ml; pH 8.0)	2 ml Tris (1M ; pH 8.0) 400 µl ETDA(0.5 M; pH 8.0)
1kb/123bp ladder stok solüsyon (500 µl)	375 µl Distile su 75 µl Stop solüsyon 50 µl Standart
EDTA (Etilen di amin tetra asetik asit)	73.06 g EDTA (0.5lt, 0.5 M ; pH 8.0) 20 g Sodyum hidroksit
Na-Asetat (Sodyum asetat tri hidrat) 5.2)	40.82 Sodyum asetat (100ml, 3M , pH
Tris (hidroksimetil amino metan)-HCl	12.11g Tris (100 ml, 1M ; ;pH 7.4,8.0,8.5
Magnezyum klorür	100 µl Stok solüsyon (2ml,50 mM) 1900 µl Distile su

dNTP	50 µl A,C,G,T bazları (her birinden)
	1 800 µl distile su
Leishmania Lysis- Buffer (0.5 lt)	1.46 g Sodyum klorür
	10 ml EDTA
	25 ml Tris-HCl
Stop solüsyon (30ml)	15 ml glycerine
	30 g Brom-fenol mavi
	6 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0)
	0.3 ml Tris (1M, pH 8.0)
Etanol (1lt)	700 ml saf Etanol (% 70)
	300 ml distile su
Kloroform- isoamil alkol	46 ml Kloroform (24:1)
	2 ml İsoamil alkol
Agaroz (100ml)	2 g agaroz
	10 ml 10 XTBE-buffer
	100 ml distile su
Proteinaz K (10 ml)	200 mg Proteinaz K
	10 ml distile su

4. BULGULAR

Çalışmamızda, visseral leishmaniasis şüphesi ile İstanbul'da bulunan çeşitli hastanelere Nisan 2002 - Nisan 2006 tarihlerini kapsayan dönem içinde başvuran 59 hastayla ilgili yaş, cinsiyet, daha önce bulunduğu il, oturduğu yer ve başvurulmuş hastane ile ilgili bilgiler Tablo 5'de gösterilmiştir.

İstanbul'da bulunan çeşitli hastanelere gidilerek kendilerinden kemik ve kan örneği alınan toplam 59 hastanın 36 (% 61)'sı erkek, 23 (% 39)'ü kadın, yaşları 1-32 arasında olup yaş ortalaması yaklaşık olarak 7'dir. Laboratuvar çalışmaları ve diğer klinik tanı testleri ile pozitifliği kesin olarak saptanan VL'li 11 hastanın 6 (% 54.6)'sı erkek, 5 (% 45.4)'i kadın yaşları 1-17 arasında olup yaş ortalaması 7.5'tir.

Araştırılan 59 VL şüpheli hastadan kesin tanısı konulanlardan 6 (% 10.1)'sı İstanbul'da, 2 (% 3.4)'si Kastamonu'da diğer 3 (% 5.1)'ü ise Kütahya, Hatay ve İzmit'te oturmaktadır (Tablo 6).

Tanı konulan 11 hastanın 6 (% 10.1)'sın da herhangi bir seyahat öyküsü olmadığı halde, 5 (% 8.5)'inde seyahat öyküsü vardır (Tablo 6).

Tablo 7'de VL şüpheli ve tanısı konulan hastaların hastanelere göre dağılımları, Tablo 8'de herhangi bir test pozitifliği saptanan VL şüpheli hastalar ile kesin tanısı konulan hastalara ait klinik belirtiler, Tablo 9'da VL kesin tanısı konulan hastaların kan biyokimyaları, Tablo 10'da VL tanısı konulan hastaların hastalığı ile ilgili olarak klinik bulguları, Tablo 11'de VL kesin tanısı konulan hastalara ait dosyalardaki bazı verilerin değerlendirilmesi gösterilmektedir.

Tablo 5 : Çalışılan 59 VL şüpheli hastanın yaş, cinsiyet, daha önce bulunduğu il, oturduğu yer ve başvurulanan hastanelerle ilgili bilgiler.

Hasta No:	Yaşı	Cinsiyet	Daha Önce Bulunduğu İl	Oturduğu Yer	Başvurulan Hastane	Hasta No:	Yaşı	Cinsiyet	Daha Önce Bulunduğu İl	Oturduğu Yer	Başvurulan Hastane
1	7	E	Uşak	Kağıthane/İST	Şişli Etfal Hastanesi	31	2	E	İstanbul	Kavacık/İST	Kartal Devlet Hastanesi
2	12	K	Zonguldak	Bağcılar/İST	Bakırköy SSK	32	6	E	İstanbul	Hasköy/İST	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
3	4	E	İstanbul	Mecidiyeköy/İST	Şişli Etfal Hastanesi	33	11	K	Sinop	Gerze/Sinop	Kartal Devlet Hastanesi
4	11	K	İstanbul	Güneşli/İST	Bakırköy SSK	34	4	E	İstanbul	İstanbul	Kartal Devlet Hastanesi
5	9	K	Kastamonu	Sultanbeyli/İST	Kartal Devlet Hastanesi	35	3	E	İstanbul	İstanbul	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
6	3	E	Sinop	Boyabat/Sinop	Şişli Etfal Hastanesi	36	3	K	İstanbul	Kavacık/İST	Kartal Devlet Hastanesi
7	7	K	Kastamonu	Kastamonu	Şişli Etfal Hastanesi	37	1	K	Tokat	Bağcılar/İST	Şişli Etfal Hastanesi
8	3	K	İstanbul	Kartal/İST	Kartal Devlet Hastanesi	38	18	E	Sivas	Çeliktepe /İST	Şişli Etfal Hastanesi
9	1	E	İstanbul	Gaziosmanpaşa/İST	Şişli Etfal Hastanesi	39	3	E	Erzurum	İstanbul	Şişli Etfal Hastanesi
10	10	K	İstanbul	Okmeydanı/İST	Şişli Etfal Hastanesi	40	11	K	Sinop	Sinop	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
11	5	E	İstanbul	Kasımpaşa/İST	Şişli Etfal Hastanesi	41	6	E	Trabzon	Maltepe/İST	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
12	6	K	Kastamonu	Kastamonu	Şişli Etfal Hastanesi	42	2	E	İstanbul	Sanayi Mah/İST	Şişli Etfal Hastanesi
13	10	E	İstanbul	Maltepe/İST	Kartal SSK	43	1	K	İstanbul	Halkalı/İST	Bakırköy SSK
14	4	E	Konya	Gaziosmanpaşa/İST	Şişli Etfal Hastanesi	44	11	K	Kastamonu	Kastamonu	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
15	12	E	İstanbul	Zeytinburnu/İST	Bakırköy SSK	45	7	E	Kayseri	Esenler/İST	Bakırköy SSK
16	7	K	İstanbul	Fatih/İST	Haseki Devlet Hastanesi	46	6	E	Kütahya	Kütahya	Afyon Kocatepe Tıp Fak
17	7	E	Uşak	Banaz/UŞAK	Şişli Etfal Hastanesi	47	4	K	Tokat	Tokat	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
18	1	E	Kastamonu	İstanbul	Şişli Etfal Hastanesi	48	4	E	Adapazarı	Adapazarı	Kartal SSK
19	5	E	İstanbul	İstanbul	Bakırköy SSK	49	5	E	Diyarbakır	Diyarbakır	Vakıf Gureba Hastanesi
20	5	K	Bursa	Bursa	Bakırköy SSK	50	6	E	Siirt	İstanbul	Şişli Etfal Hastanesi
21	2	K	Siirt	Sultanbeyli/İST	Kartal Devlet Hastanesi	51	6	E	Kastamonu	İnebolu/Kastamonu	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
22	1	K	İstanbul	Fatih/İST	İstanbul Tıp Fakültesi	52	3	E	Zonguldak	Zonguldak	Şişli Etfal Hastanesi
23	2	E	İstanbul	Çengelköy/İST	Şişli Etfal Hastanesi	53	3	K	Tokat	Pendik/İST	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
24	17	K	Çorum	Gültepe /İST	İstanbul Tıp Fakültesi	54	16	E	Kars	İzmit	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
25	1	E	İstanbul	İstanbul	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	55	2	E	Mardin	Kartal/İST	Kartal Devlet Hastanesi
26	15	E	Van	Tatvan/VAN	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	56	6	E	Urfa	Sultanbeyli/İST	Kartal SSK
27	28	E	Çorum	İstanbul	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	57	1	E	İstanbul	Fatih/İST	Şişli Etfal Hastanesi
28	10	K	Adana	İstanbul	Şişli Etfal Hastanesi	58	35	E	Urfa	Çeliktepe /İST	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
29	2	K	Kastamonu	İnebolu/Kastamonu	Şişli Etfal Hastanesi	59	2	K	İstanbul	İkitelli/İST	Bakırköy SSK
30	12	E	Hatay	Hatay	Şişli Etfal Hastanesi						

Tablo 6: Visseral Leishmaniasis kesin tanısı konulan hastaların seyahat öykülerinin bazı demografik özelliklerle karşılaştırılması.

Hasta No	Yaşı	Cinsiyet	Daha Önce Bulunduğu İl	Oturduğu Yer	Başvurulan Hastane	Seyahat Öyküsü
1	7	E	Uşak	Kağıthane/İST	Şişli Etfal Hastanesi	+
2	12	K	Zonguldak	Bağcılar/İST	Bakırköy SSK	+
3	4	E	İstanbul	Mecidiyeköy/İST	Şişli Etfal Hastanesi	-
12	6	K	Kastamonu	Kastamonu	Şişli Etfal Hastanesi	-
29	2	K	Kastamonu	İnebolu/Kastamonu	Şişli Etfal Hastanesi	-
30	12	E	Hatay	Hatay	Şişli Etfal Hastanesi	+
31	2	E	İstanbul	Kavacık/İST	Kartal Devlet Hastanesi	-
36	3	K	İstanbul	Kavacık/İST	Kartal Devlet Hastanesi	-
43	1	K	İstanbul	Halkalı/İST	Bakırköy SSK	-
46	6	E	Kütahya	Kütahya	Afyon Kocatepe Tıp Fak	+
54	16	E	Kars	İzmit	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	+

Tablo 7: Visseral Leishmaniasis şüpheli hastalar ve tanısı konulan hastaların hastanelere göre dağılımı.

Hastane	Şüpheli hasta sayısı	%	Pozitif tanı konulan hasta sayısı	%
Şişli Etfal Hastanesi	22	37.2	5	45.4
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	13	22	2	18.2
Bakırköy SSK	8	13.6	2	18.2
Kartal Devlet Hastanesi	8	13.6	1	9.1
Kartal SSK	3	5.1	-	-
İstanbul Tıp Fakültesi	2	3.4	1	9.1
Haseki Devlet Hastanesi	1	1.7	-	-
Vakıf Gureba Hastanesi	1	1.7	-	-
Afyon Kocatepe Tıp Fak	1	1.7	-	-
Toplam	59	100	11	100

Tablo 8 : Çalışmada herhangi bir test pozitifliği saptanan Visseral Leishmaniasis şüpheli hastalar ile kesin tanısı konulan hastalara ait klinik belirtiler.

Klinik Belirtiler	Şüpheli hastalar				Toplam		Tanısı konulan hastalar				Toplam	
	var		yok				var		yok			
	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%
Ateş	16	84.2	3	15.8	19	100	10	90.9	1	9.1	11	100
Halsizlik	9	47.4	10	52.6	19	100	7	63.6	4	36.4	11	100
Karın ağrısı	2	10.5	17	89.5	19	100	1	9.1	10	90.9	11	100
Terleme	4	21	15	79	19	100	1	9.1	10	90.9	11	100
İştahsızlık	3	15.8	16	84.2	19	100	1	9.1	10	90.9	11	100
Anemi	16	84.2	3	15.8	19	100	11	100	0	00	11	100

Tablo 9: Visseral Leishmaniasis kesin tanısı konulan hastaların kan biyokimyaları.

Hasta no	Kan parametreleri sonuçları					
	Hemoglobin g/dl	Hemotokrit %	Eritrosit 10 ³ +10 ³ /uL	Lökosit 10 ³ /uL	Trombosit 10 ³ /uL	Kan Transfüzyonu var yok
1	8.9	26.8	2.95	3.9	65	-
2	9.6	27.5	3.08	3.5	47	-
3	7.6	24.3	2.79	2.9	61	-
12	6.4	20.4	2.32	3.1	29	+
29	7.2	21.0	2.35	2.6	58	-
30	6.9	21.5	2.47	2.8	54	-
31	9.1	27.0	3.07	3.6	81	+
36	7.8	24.4	2.81	4.0	44	+
43	5.9	18.0	2.15	3.2	37	-
46	6.7	19.0	2.24	4.6	9	+
59	8.4	25.0	2.86	5.2	69	-

Tablo 10: Visseral Leishmaniasis tanısı konulan hastaların hastalığı ile ilgili olarak aktif dönemde var olan fiziksel inceleme bulguları.

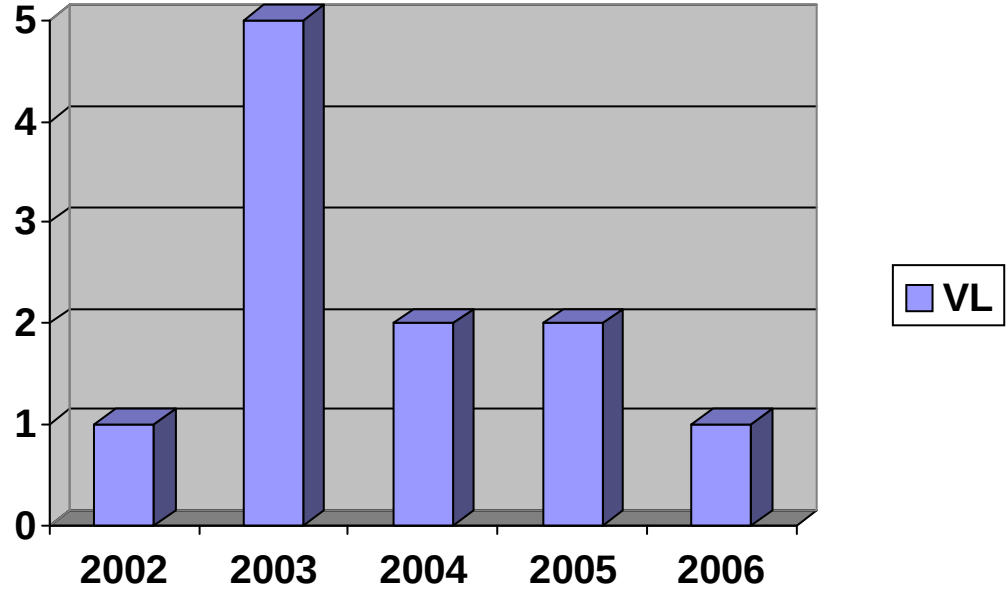
Fiziksel muayene	sonuçlar			
	var sayı	%	yok sayı	%
Hepatomegali	10	90.9	1	9.1
Splenomegali	11	100	-	-
Karın şişliği	8	72.7	3	27.3
Zayıflama	2	18.2	9	81.8
Döküntü	1	9.1	10	90.9
Deride pigmentasyon	2	18.2	9	81.8

Tablo 11: Visseral Leishmaniasis kesin tanısı konulan hastalara ait dosyalardaki bazı verilerin değerlendirilmesi.

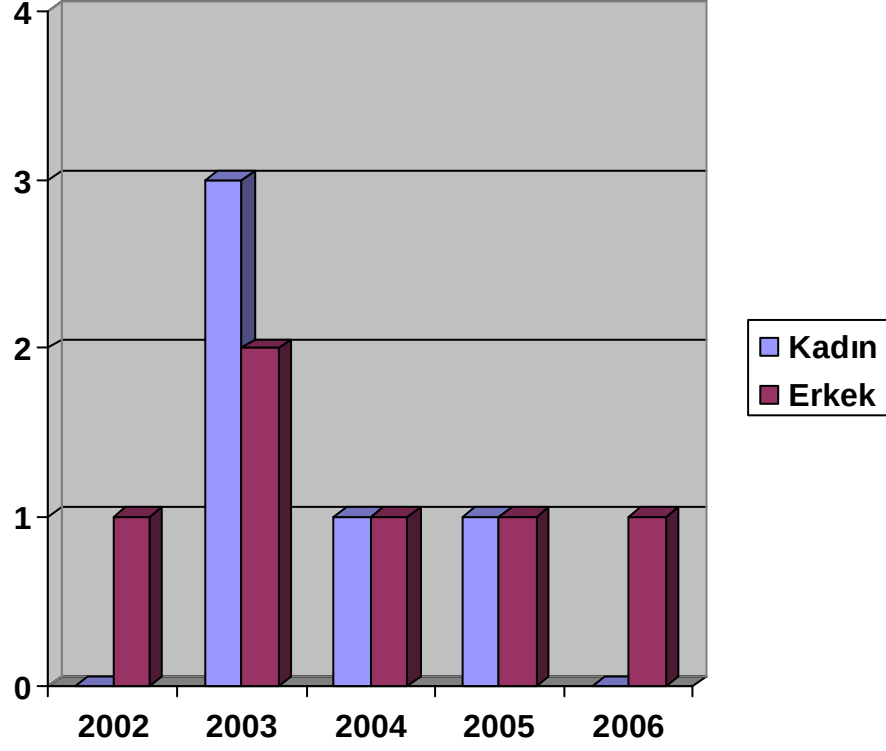
Hasta no	Sevk edilme tanısı	İlk sağlık kuruluşu	Tanı için geçen ortalama süre
1	Sebepsiz ateş	Uşak Devlet Hast.	3 ay
2	Şiddetli eklem ağrısı	Zonguldak Devlet Hast.	5 ay
3	Yüksek Ateş	Şişli Etfal Hast.	1.5 ay
12	Halsizlik+Sarılık	Kastamonu Devlet Hast.	2 ay
29	Karın şişliği	Kastamonu Devlet Hast.	6 ay
30	Karın şişliği	Hatay Devlet Hast.	6 ay
31	Yüksek ateş	Kartal Devlet Hast	2 ay
36	Anemi +Kilo kaybı	Kartal Devlet Hast.	1.5 ay
43	Anemi	Bakırköy SSK	1.5 ay
46	Anemi +Ateş	Kütahya Devlet Hast. Afyon Kocatepe Tıp Fak.	3 ay
54	Karın şişliği+Anemi	Çanakkale Devlet Hast. Uludağ Tıp Fak.	8 ay

Grafik 1’de Visseral Leishmaniasis (VL) kesin tanısı konulan hastaların yıllara göre, Grafik 2’de Visseral Leishmaniasis (VL) kesin tanısı konulan hastaların cinsiyet ve yıllara göre , Grafik 3’te Sağlık Bakanlığı yıllık verilerine göre ülkemizde bildirilen Visseral Leishmaniasis (VL) olgularının yıllara göre, Grafik 4’de Sağlık Bakanlığı yıllık verilerine göre İstanbul’da bildirilen Visseral Leishmaniasis (VL) olgularının yıllara göre dağılımları gösterilmiştir. Grafiklerde dikey koordinat eksenini olgu sayısını, yatay koordinat eksenini ise yılları göstermektedir.

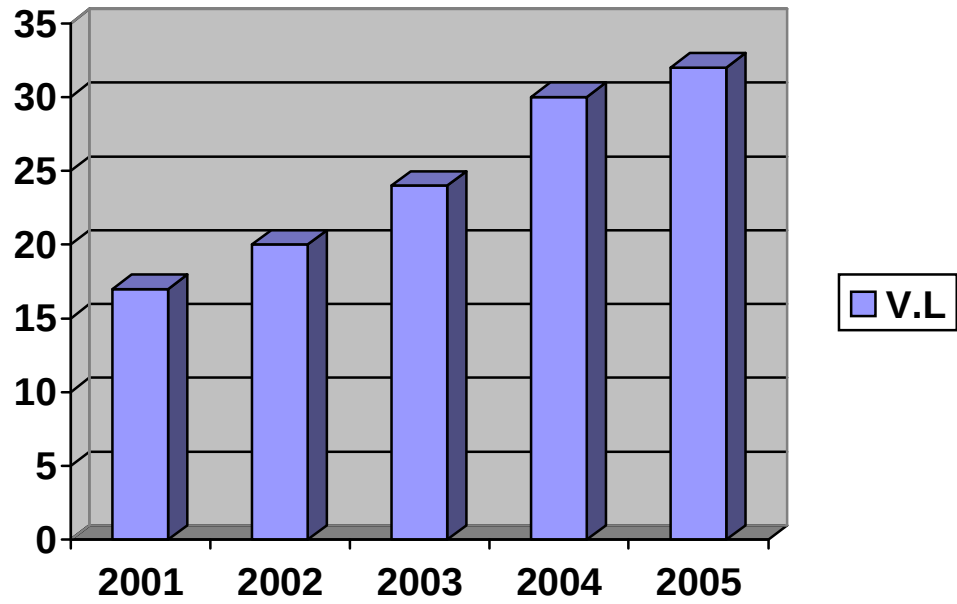
Grafik 1: Visseral Leishmaniasis (VL) kesin tanısı konulan hastaların yıllara göre dağılımı.



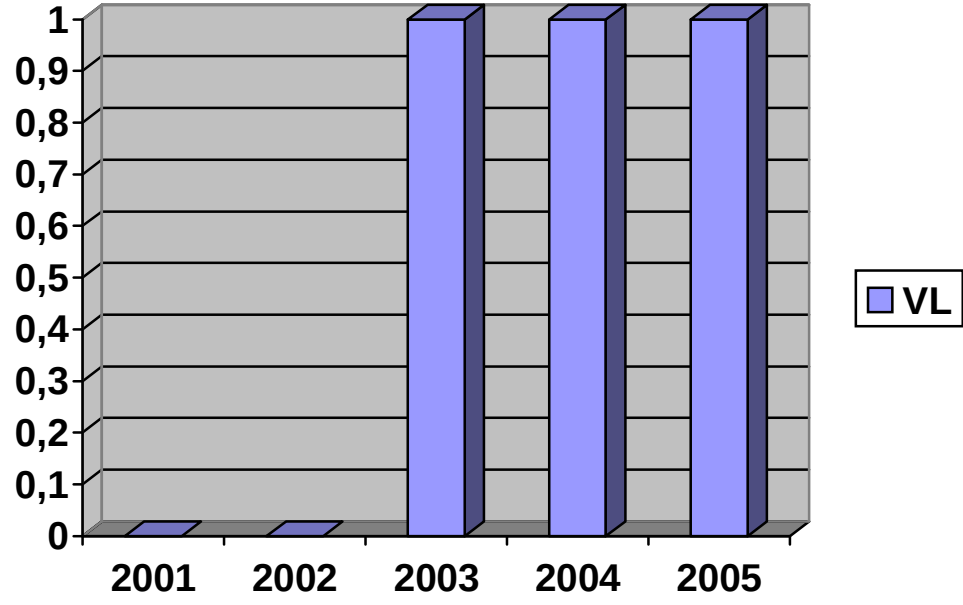
Grafik 2 : Visseral Leishmaniasis (VL) kesin tanısı konulan hastaların cinsiyet ve yıllara göre dağılımı.



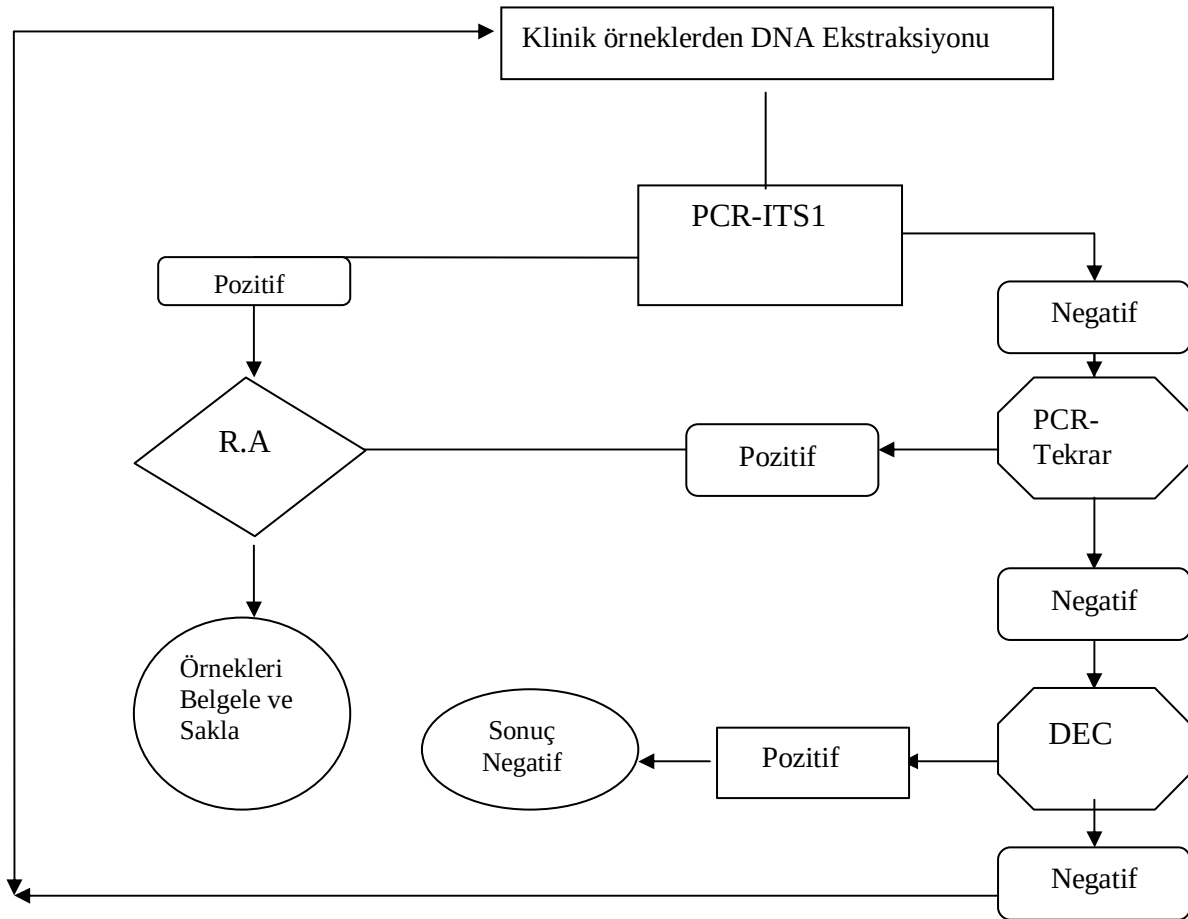
Grafik 3: Sağlık Bakanlığı yıllık verilerine göre ülkemizde bildirilen Visseral Leishmaniasis (VL) olgularının yıllara göre dağılımı.



Grafik 4 : Sağlık Bakanlığı yıllık verilerine göre İstanbul’da bildirilen Visseral Leishmaniasis (VL) olgularının yıllara göre dağılımı.



Visseral Leishmaniasis'in PCR tanımlanmasında yapılması gereken aşamalar diyagram 1'de gösterilmiştir.

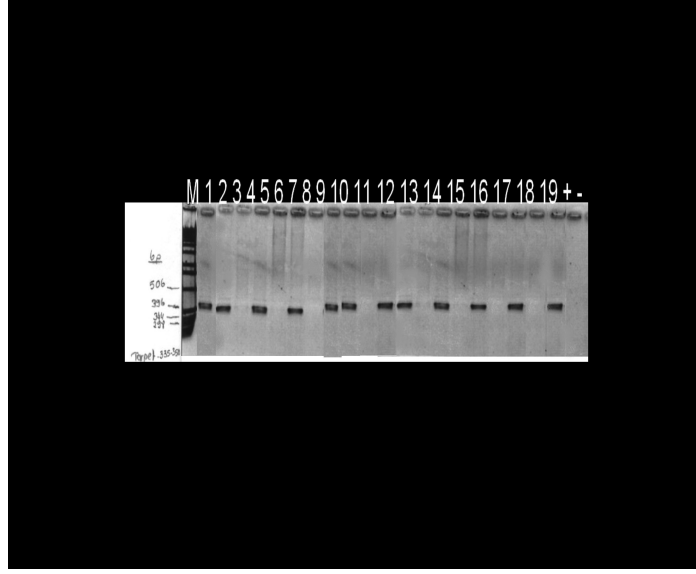


R.A : Restriksiyon Analiz

DEC : DNA Ekstraksiyon Kontrol

Diyagram 1: Tüm klinik örneklerden Visseral Leishmaniasis'in PCR tanımlanması için oluşturulan diyagram.

Çalışılan kemik iliği örneklerinde PCR-ITS1, DEC, Nesdet-PCR, R.A (RFLP), ürünlerinin Agaroz-Jelde yürütüldükten sonra elde edilen bantlar Resim 5-8'de gösterilmiştir.



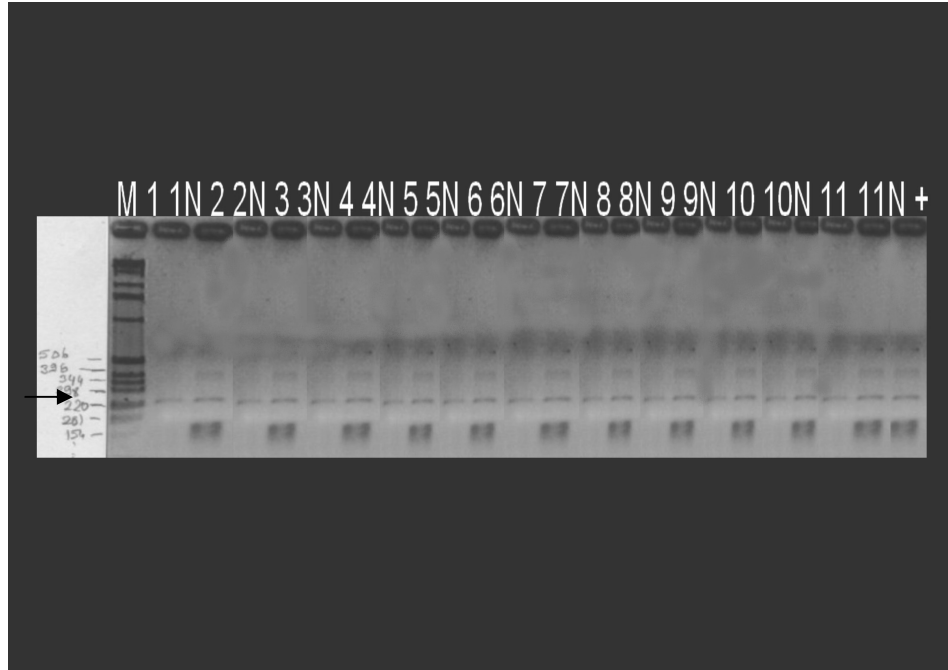
Resim 5: Çalışılan kemik iliği örneklerinde PCR-ITS1 ürünlerinin Agaroz-Jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsü (M = marker).



Resim 6: Çalışılan kemik iliği örneklerinde DEC ürünlerinin Agaroz-Jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsü (M = marker).



Resim 7 : Çalışılan kemik iliği örneklerinde Nesdet-PCR ürünlerinin Agaroz-Jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsü (M = marker).



Resim 8: Çalışılan kemik iliği örneklerine ait PCR [R.A (RFLP)] ürünlerinin hepsi birlikte Agaroz-Jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsü (M = marker N= nested ürünleri).

Çalışmamızda VL şüpheli 59 hastadan alınan kemik iliği ve kan örnekleri değerlendirilmiştir (Tablo 12). Bunların 19 (%32.2)'unda bir ya da daha fazla pozitiflik saptanmıştır. Bu hastaların Giemsa boyası ile boyanan yayma preparatlarında 7 (% 11.8) hastanın mikroskopik incelemesinde *Leishmania*'nın amastigot şekilleri görülmüş ve tüm laboratuvar tanı testleri pozitif bulunmuştur. Ayrıca 4 (% 6.8) hastanın Giemsa boyası ile boyanan yayma preparatların mikroskopik incelemesi ve kültür sonucu pozitif iken tüm serolojik testleri negatif bulunmuş, yine bunların PCR sonuçları da pozitif olarak belirlenmiştir. Hastalardan 4 (% 6.8)'ünün direkt mikroskopik inceleme, kültür sonuçları ve PCR' ı negatif olduğu halde Formol-jel, ELISA IgG (>1.1 ISR) , IFAT IgG (>1/256) testleri pozitif bulunmuştur. Çalışılan kemik iliği örneklerinden NNN besiyerlerinde üretilen *Leishmania* kültürlerinden 11 (% 18.6) 'ne PCR (PCR-ITS1,DEC, Nesdet-PCR, RFLP) yapılarak bunların *Leishmania infantum* olduğu belirlenmiştir (Diyagram 1).

Ayrıca hastalardan 2 (% 3.4)' sinde *Plasmodium vivax* (sıtma etkeni) görülmüştür.

1(%1.7)'sine *Leptospira* tanısı konulurken, 1 (%1.7)'ine de Pnömoni tanısı konmuştur (Tablo 12, 13). Hastalardan 40 (% 67.8)'ın da direkt mikroskopik incelemeler, kültür , serolojik testler ve PCR sonuçları negatif bulunmuştur (Tablo 13). Pozitiflik saptanan hastaların laboratuvar tanı test sonuçlarının her birini PCR ile karşılaştırılarak istatistiksel Kappa testine göre değerlendirilmesi yapılmıştır.

Değerlendirmede direkt mikroskopik tanıda kappa katsayısı (κ)'nın bu iki test için güçlü ($\kappa = 0.80$) aynı yönde bir bağıntı olduğu ve olasılık değerlendirilmesi (p)'nin geçerli ($p<0.000$) bir uyum olduğu saptanmıştır. Kültür için tam güçte ($\kappa =1.00$) aynı yönde bir bağıntı ve geçerli ($p<0.000$) bir uyum olduğunu, ELISA için orta güçte ($\kappa = 0.51$) bir bağıntı ve geçerli $p<0.000$ bir uyum olduğu, IFAT için orta güçte ($\kappa = 0.55$) bir bağıntı ve geçerli $p<0.000$ bir uyum olduğu bulunmuştur. Formol-Jel 'de ise bu oran zayıf ($\kappa = 0.45$) bir bağıntı ve geçerli ($p<0.000$) bir uyum olduğu saptanmıştır (Tablo 14).

Tablo 12 : Visseral Leishmaniasis şüpheli tüm hastaların klinik tanılarına ait laboratuvar sonuçları.

Hasta no	Direkt	Kültür	ELISA	IFAT	Formol-Jel	PCR	Hasta no	Direkt	Kültür	ELISA	IFAT	Formol-Jel	PCR	Hasta no	Direkt	Kültür	ELISA	IFAT	Formol-Jel	PCR
1	+	+	+	+	+	+	21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	+	+	+	+	+	+	22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	42	(-)	(-)	+	+	+	(-)
3	+	+	+	+	+	+	23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	43	+	+	(-)	(-)	(-)	+
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	24	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	44	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	45	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	+	+	+	(-)	26	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	46	+	+	(-)	(-)	(-)	+
7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	27	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	47	(-)Lep	(-)	(-)	(-)	+	(-)
8	(-)Pnö	(-)	(-)	(-)	+	(-)	28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	48	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	29	+	+	(-)	(-)	(-)	+	49	(-)Sıtma	(-)	+	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	30	+	+	+	+	+	+	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	31	+	+	+	+	+	+	51	(-)	(-)	+	+	+	(-)
12	+	+	+	+	+	+	32	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	52	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	33	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	53	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	54	+	+	+	+	+	+
15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	55	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	36	+	+	(-)	(-)	(-)	+	56	(-)Sıtma	(-)	(-)	(-)	+	(-)
17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	37	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	57	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	(-)	(-)	+	+	+	(-)	38	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	58	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	39	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	59	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)							

Tablo 13: Visseral Leishmaniasis şüpheli hastaların tanı testlerinde bir ya da daha fazla pozitiflik saptanan hastaların dağılımı.

Sıra no	Hasta no	Direkt	Kültür	ELISA	IFAT	Formol- Jel	PCR
1	1	+	+	+	+	+	+
2	2	+	+	+	+	+	+
3	3	+	+	+	+	+	+
4	6	(-)	(-)	+	+	+	(-)
5	8	(-)Pnö	(-)	(-)	(-)	+	(-)
6	12	+	+	+	+	+	+
7	18	(-)	(-)	+	+	+	(-)
8	29	+	+	(-)	(-)	(-)	+
9	30	+	+	+	+	+	+
10	31	+	+	+	+	+	+
11	36	+	+	(-)	(-)	(-)	+
12	42	(-)	(-)	+	+	+	(-)
13	43	+	+	(-)	(-)	(-)	+
14	46	+	+	(-)	(-)	(-)	+
15	47	(-)Leptospira	(-)	(-)	(-)	+	(-)
16	49	(-)Sıtma	(-)	+	(-)	(-)	(-)
17	51	(-)	(-)	+	+	+	(-)
18	54	+	+	+	+	+	+
19	56	(-) Sıtma	(-)	(-)	(-)	+	(-)

Tablo 14 : Visseral Leishmaniasis şüpheli hastalar ve laboratuvar testlerinin PCR ile karşılaştırılması sonucunda ortaya çıkan istatistiksel değerlendirmeler.

		PCR (0) N	PCR (1) N	KAPPA*	
				κ	p
DİREKT MİKROSKOP	(0)	44 (91,7)	0 (0)	0,80	0,000
	(1)	4 (8,3)	11 (100)		
KÜLTÜR	(0)	48 (100)	0 (0)	1,00	0,000
	(1)	0 (0)	11 (100)		
ELISA	(0)	43 (89,6)	4 (36,4)	0,51	0,000
	(1)	5 (10,4)	7 (63,6)		
IFAT	(0)	44 (91,7)	4 (36,4)	0,55	0,000
	(1)	4 (8,3)	7 (63,6)		
FORMOL-JEL	(0)	41 (85,4)	4 (36,4)	0,45	0,000
	(1)	7(14,6)	7 (63,6)		

N = Hasta sayısı

(0) = Negatif hasta

(1) = Pozitif hasta

κ = Kappa katsayısı

p = Olasılık değeri

* Kappa korelasyon ve olasılık değerlendirmesi (SPSS 11.5 programında)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Visseral leishmaniasis dünyanın çeşitli ülkelerinde ve Türkiye'nin değişik bölgelerinde görülen, enfekte dişi tatarcıkların sokması ile bulaşan bir enfeksiyondur. Hastalığın etkeni Trypanosom ailesinin Leishmania genusuna ait protozoonlardır. Leishmaniasis'de konak; insan, köpek ve küçük kemiricilerdir. Her yıl 1-1,5 milyonu CL, 500.000'i VL olmak üzere toplam 1,5-2 milyon yeni olgunun ortaya çıktığı ve tüm dünyada toplam 12 milyon leishmaniasis olgusunun bulunduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca yine tahminlere göre, her yıl 200 000 kişinin VL nedeni ile öldüğü ileri sürülmektedir (57, 59, 68).

Bu hastalık Hindistan dışındaki ülkelerde zoonozdur. VL'e yurdumuzun hemen hemen bütün bölgelerinde sporadik olarak rastlanır. Ülkemizde de yıllık ortalama 40 olgu bildirimi şeklinde olup resmi çalışmalarla sunulmuştur. Bu çalışmamızı; VL şüpheli hastaların hastalığı süresince karşılaşmış oldukları tanı sorunlarının neler olabileceğinin belirlenmesi gerektiğini düşünerek, prospektif bir çalışma şeklinde planladık. Dolayısı ile İstanbul'da değişik hastanelere hem İstanbul'dan hemde diğer illerden VL şüphesi ile başvuran hastalardan alınan kemik iliği ve kan örneklerine PCR ve diğer laboratuvar tanı testlerini uygulayarak çalışmamızı tamamladık.

Araştırmamızda VL şüphesi ile İstanbul'daki çeşitli hastanelere gidilerek örnek alınan 59 hastadan VL tanısı konulan 11 hastanın yaş ve cinsiyet ile ilgili olarak yapılan değerlendirmesinde, bu hastalığa yakalananlar arasında çocukların ilk sırayı aldığı, erkeklerin de kadınlara oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir.

VL'in her yaş grubunda görülebildiği fakat bulunduğu bölge ve çevre şartlarıyla da değişkenlik gösterebileceği bildirilmiştir (1, 3, 23). VL'li genç olgu sayısı hastalığın yayılmasında bölgemiz için de bir değişkenlik göstermiştir.

Ayrıca yapılan çalışmalarda VL'in erkeklerde daha sık görüldüğü araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (2, 37, 47).

Çalışmamızda VL kesin tanısı konulan 11 hastadan İstanbul ilinde ikamet eden hastalar olabildiği gibi İstanbul dışından da hastaların olması, VL'in yurdumuzda değişik illerden bildirimlerin olduğunu bize bir kez daha göstermiştir (Tablo 5, 6). Günümüzde artmış seyahat imkanları ve bazı sosyo-ekonomik nedenlerle yaşanan göçler hastalığın bir yerden başka bir yere taşınmasını kolaylaştırmıştır. İstanbul gibi bir mega kentte VL olgularının bildirilmesi, İstanbul'da saptanan rezervuar köpekler ve vektörlük yapan phlebotomlar yönünden önlemlerin alınması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

VL tanısı konulan 11 hastanın İstanbul'da başta devlet hastaneleri olmak üzere üniversite hastanelerine tanı ve tedavi amacıyla başvurmuşlardır (Tablo 7). Fakat bazı kurumlardaki mevcut alt yapı, teknik donanım ve özellikle spesifik konularda yetişmiş tecrübeli elaman eksikliği nedeniyle tanı koymada bir takım güçlükleri de ortaya çıkarmıştır. Leishmaniasis gibi bir çok hastalığın klinik belirtileri ile benzer belirtiler vermesi ve diğer bazı hastalıklarla karışması muhtemel olan bir hastalığın tanısının konması da gerçekten zor olduğu unutulmamalıdır. Hekim standart vaka tanımına göre tanı koyabileceği ölçüde bir hastasına yardımcı olmakla yükümlüdür. Tanı ve tedavide yeterince hastaya yardımcı olamıyorsa, gerektiğinde onun hastalığı ile ilişkili olarak başka bir yere yönlendirmesi gerekmektedir.

Leishmaniasis'de hastalığın doğru teşhis edilmesi ve tedavisinin ona göre yapılması esastır. Bunun için bu konuda eğitilmiş uzmanlara ve sağlık teknisyenlerine ihtiyaç vardır. VL bulaşması ve kontrolü hakkında halk eğitilmelidir. Bu hastalığın görüldüğü yerlerde en azından leishmaniasis ile ilgili serolojik, mikroskopik ve kültür gibi testlerin yapılması gereklidir. Leishmaniasis ile uyumlu klinik belirti gösteren; insan veya köpeklerin daha ileri tetkiklerinin yapılması düşünülmelidir (4, 35, 47, 53, 71).

Testlerinde herhangi birisi pozitif olan VL şüpheli hastalar ve tanısı konulan hastalara ait almış olduğumuz klinik anemnezlere ait değerlendirmenin bulunduğu hasta izleme formundan (Ek 1 izlem formu); aneminin her iki grup için tanı koymada önemli bir kriter olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca ateş, halsizlik gibi belirtilerin yanı sıra, daha az saptanan karın ağrısı, terleme ve iştahsızlık gibi belirtilerde VL hastaların tanısında önemli olduğu bu çalışmada ortaya konmuştur (Tablo 8). VL tanısı konulan hastaların kan biyokimyalarına bakıldığında; hemoglobin, hemotokrit, lökosit, eritrosit ve trombosit değerlerinin de düşük olduğu görülmüştür. Dolayısı ile bu hastalara kan transfüzyonunun yapılmamasının bir eksiklik olduğu saptanmıştır (Tablo 9). Bu konuda yapılan çalışma sonuçlarının, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla benzer olması bu konunun önemini bir kez daha ortaya koymuştur (6, 25, 47).

VL tanısı konulan hastaların, hastalığın aktif dönemlerinde saptanan fiziksel inceleme bulguları; hepatomegali ve splenomegali'nin hastaların çoğunda (% 90'ların üzerinde) görülmektedir. Ayrıca karın şişliği yaklaşık olarak hastaların % 73'de saptanması da tanı koymada önemli bir kriterdir (Tablo 10). Bu fiziksel bulguları; zayıflama, deride pigmentasyon ve döküntü gibi semptomların izlemesi VL tanısında aktif dönemde araştırılması gereken bir durumdur.

VL'de klinik bulgularının başka hastalıklarla karışmasından dolayı farklı hastalıklar akla gelmekte ve bunlara yönelik tedaviler yapılmaktadır. Bu hastalarda sıklıkla görülen hepatosplenomegali ve pansitopeniden dolayı yapılan etiyolojik araştırmalarda VL tanısı konulan ilginç olgu bildirimleri vardır (16, 123, 124). Bu sebeple ateş, splenomegali ve pansitopeni tablosu ile gelen hastalarda VL tanısının akla getirilmesi ve öncelikle serolojik testler yapıldıktan sonra pozitif olarak saptanan hastalardan kemik iliği incelenmesi yapılmalıdır.

İstanbul’da VL tanısı konulan hastaların 2002-2006 yılının ilk altı ayı itibarı ile dağılımlarına bakıldığında 2003 yılında bu dağılımın diğer yıllara göre en fazla olduğu (Grafik1), kadın erkek arasında ise çok belirgin bir hasta dağılımının olmadığı saptanmıştır (Grafik 2).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre yıllık yapılan resmi hasta bildirimlerinde Türkiye genelinde bir artış eğilimi gözlenmektedir (Grafik 3). İstanbul ili verilerinde ise belirgin bir artış eğilimi olmadığını göstermektedir (Grafik 4). Yurdumuzda zaman zaman değişik illerden yapılan bildirimlerin Sağlık Bakanlığı verilerinden daha fazla olduğu ve bildirimi zorunlu bir hastalık olmasına karşın yeterli bir bildirimin yapılmadığını göstermektedir. VL’in bildirimi zorunlu bir hastalık olmasına karşın düzenli bir biçimde uygulanmaması da hastalığın eridikasyonunda önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Klinisyenlerin vaka tanımını kullanarak bildirim yapabilmesi için de hastalık tanısının standart laboratuvar prosedürleri ile elde edilmiş bulgulara dayalı olması gereği kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. Bir diğer ifade ile yeni bildirim sisteminde klinik gözleme değil, laboratuvar bulgusuna dayalı bildirim esas alınmalıdır. Bu nedenle, ülkemizdeki tüm kamu kuruluşlarına ait laboratuvarlarda uygulanmak üzere bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısı ile böyle bir hastalıkta yapılan uygulama hatalarının ortadan kaldırılması ancak yapılacak yasal düzenlemelerle mümkün olacaktır.

VL tanısı konulan hastalara ait dosyalardan yaptığımız araştırmada hastalığın sevk edilme tanısında çoğu zaman diğer bir çok hastalıklarla karıştırılabilecek verilere sahip olduğu belirlenmiştir. İlk sağlık kuruluşuna başvurunun çoğu zaman devlet hastaneleri ve üniversitelere bağlı tıp fakültelerine yapıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu hastalara kesin tanı konulana kadar geçen zamanın ise 1.5 ile 8 ay arasında değişen bir süreyi kapsadığı saptanmıştır (Tablo 11).

VL klinik tablosu pek çok hastalığa benzediğinden birçok hastalıkla karıştırılması mümkündür. Fakat klinik tanıda bir takım şikayetlerle gelen hastanın yapılan muayene ve tetkikleri sonucunda hastalığın ön tanısı konulurken leishmaniasis'in klinik belirtileriyle uyumlu olan bu tabloların da göz önüne alınması gereklidir. Ön tanıda VL ile uyumlu olan hastalar değerlendirilirken daha da özenli olmak zorundayız.

Leishmaniasis'in bazı bölgelerimizde sporadik olarak görülmesinin nedeni, Visseral ve deri formunun diğer bir çok hastalıkla aynı bulguları vermesi yüzünden ayırıcı tanıda öncelikle düşünülmemesidir. Endemik bölgelerde yapılan çalışmaların bu konuya ışık tutması, o bölgelerdeki hekim ve veteriner hekimleri bilgilendirmesi açısından önem taşımaktadır

Hastalığın çoğu şehirlerde var olan hastanelerde bile kolayca tanımlanamaması da ilginçtir. Sorunun, mevcut hastanelerimizde ya yeterli alt yapı ve donanım eksikliği ya da böyle bir eksikliği olmasa bile kalifiye eleman eksikliğinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Bu eksikliğin giderilmesinin tanıda yapılacak hataları en aza indireceği bir gerçektir. Bu da bize hekimlerin yetiştirilmesinde üniversitelerdeki deneyimli personellerin onlara sağlayacağı eğitim aşamasında verecekleri geniş kapsamlı uygulama programlarıyla mümkün olacaktır. Leishmaniasis paraziter hastalıklar içerisinde gerek tanı ve tedavisinin gerekse kontrolünün zor olması nedeniyle önemli bir toplumsal hastalıktır. Bu nedenle Leishmaniasis'le mücadele edebilmede ilk şart bu hastalığı iyi takip edebilmek, tanı ve tedaviyi de ona göre değerlendirmektir. Yine burada hastalığın tanısını koymada geçen uzun zaman aralıklarını da en aza indirmeyi esas almalıyız. Çünkü tanı ne kadar uzar ve gecikirse hastaya uygulanacak tedavide o oranda uzar bu da bize hem hastayla ilgili hem de uygulamadaki aksamalarla ilgili büyük sorunlar olarak geri dönebilir.

Çalışmamızda laboratuvar tanısında VL şüpheli klinik örnekleri alınan toplam 59 hasta değerlendirilmiştir (Tablo 12). Bunların 19 (%32.2) 'unda bir ya da daha fazla test yöntemiyle pozitiflik saptanmıştır (Tablo 13). Bu hastaların Giemsa boyası ile boyanan

yayma prepratlarında 7 (% 11.8) hastanın mikroskopik incelemesinde leishmania'nın amastigot şekilleri görülmüş ve tüm laboratuvar tanı testleri de pozitif bulunmuştur. Ayrıca 4 (% 6.8) hastanın Giemsa boyası ile boyanan yayma prepatların mikroskopik incelemesi ve kültür sonucu pozitif iken tüm serolojik testleri negatif bulunmuş, yine bunların PCR sonuçları da pozitif olarak belirlenmiştir. Hastalardan 4 (% 6.8)'ünün direkt mikroskopik inceleme, kültür sonuçları ve PCR' ı negatif olduğu halde Formol-jel, ELISA IgG (>1.1 ISR), IFAT IgG (>1/256) testleri pozitif bulunmuştur. Çalışılan kemik iliği örneklerinden NNN besiyerlerinde üretilen leishmania kültürlerinden 11 (%18.6) 'ne PCR (PCR-ITS1,DEC, Nesdet-PCR, RFLP) yapılarak bunların *Leishmania infantum* olduğu belirlenmiştir. (Diyagram1) Ayrıca hastalardan 2 (% 3.4)'sinde *Plasmodium vivax* (sıtma etkeni) görülmüştür. 1 (%1.7)'sine Leptospiroz tanısı konulurken, 1 (% 1.7)'ine de Pnömoni tanısı konmuştur. Hastalardan 40 (% 67.8)'ında direkt mikroskopik incelemeler, kültür, serolojik testler ve PCR sonuçları negatif bulunmuştur (Tablo 12). Pozitiflik saptanan hastaların laboratuvar tanı test sonuçlarının her birini PCR ile karşılaştırılarak istatistiksel kappa testine göre değerlendirilmesi yapılmıştır (Tablo 14). Değerlendirmede kültürün PCR ile güçlü düzeyde anlamlılığı gösterdiğini, direkt mikroskopik tanının anlamlı olduğunu, ELISA ve IFAT tanı testlerinin orta güçte bir bağıntı gösterdiği ve Formol-Jel 'de ise bu oran zayıf bir bağıntı gösterdiği saptanmıştır.

Paraziter enfeksiyonların tanımlanmasında klinik semptomlar, klinik hikaye, seyahat öyküsü, coğrafi yerleşim gibi faktörlerin yanı sıra laboratuvar yöntemleri de kullanılmaktadır. Son yıllarda laboratuvar tanı yöntemleri arasında nükleik aside dayalı teknolojiler de yer almaktadır. İnfekte organlardan elde edilen örneklerde, genelde parazitin az miktarda veya a tipik morfolojide bulunması ve kültür yöntemindeki kontaminasyon riski nedenleriyle leishmania parazitlerin saptanmasında güçlükler olabilmektedir. Parazitin direkt saptanmasına yönelik yöntemler güvenli olmasına karşın hassasiyet düşüktür. Bu

nedenle hasta kanı gibi kolaylıkla elde edilebilecek bir örnek kullanılarak PCR uygulanabilir (53, 54, 82, 125).

Ülkemizde Leishmaniasisin visseral ve deri formunun endemik ve sporadik olarak görülmesi, VL'e rezervuarlık yapan köpeklerde enfeksiyonun insanlara göre çok daha yüksek oranda saptanması, bu hastalığın ve hem insanlarda hem de köpeklerdeki ayırıcı tanısının önemini arttırmaktadır.

Ayırıcı tanıda VL düşünülen hastalarda invaziv olmayan ve yüksek derecede duyarlılık ve özgüllük gösteren serolojik testler tanıda büyük oranda yardımcı olmaktadır. Altın standart olarak kemik iliği aspirasyon yaymasında parazitlerin gösterilmesi kabul edilir. Fakat kemik iliği aspirasyonu işlemi sırasında zaman zaman kanama olabilmekte, yetersiz materyal alınabilmekte ve örnekte amastigota rastlanmayabilmektedir. Alınan örnekte çok az sayıdaki parazitin DNA'sını saptayabilen PCR yönteminin kullanılması ile tanının duyarlılık ve özgüllüğünü arttırmakta ve gelecekte altın standart olması için bir alternatif olarak gözükmemektedir. Tedavi takibinde kemik iliği aspirasyonu uygulanmasında ise parazit tedavi nedeniyle tam kaybolmasa bile azalmakta ve direkt mikroskobide saptanmasında zorluklar yaşanmaktadır. Piarroux ve ark. VL tanısında hiç bir yöntemin %100 hassasiyet göstermediğini, en hassas yöntemin PCR olduğunu bildirmişlerdir (126). Serolojik yöntemlerin de yüksek derecede hassasiyet gösterdiğini, ancak relapsların tanımda başarısız bulunduğunu belirtmişlerdir. Ülkemizde VL tanısında PCR yöntemi çalışmamız da ilk kez uygulanmış olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak PCR yönteminin uygulanmasında bir takım zorlukların yanı sıra; pahalı oluşu, kontaminasyon riski, yüksek maliyet gerektiren teknik donanım gibi dezavantajları vardır.

Almanya da 2 yılda 70 hastanın 23 'üne PCR ile VL tanısı konulmuştur (123).

Mathis ve Deplazes'de insan ve köpeklerden alınan klinik örneklerde ssrRNA gen sekansı ile PCR uygulamışlar ve kültür sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Yalnızca bir örnekte PCR

ile yanlış negatif sonuç almışlar ve bunu örneğin uygun alınamamasına bağlamışlardır (127).

Schönian ve ark. değişik klinik örneklerde farklı PCR yöntemleri uygulayarak leishmania'nın tanısında PCR'ın önemini ortaya koymuşlardır. Ayrıca tür tanımında RFLP (RA)'nin çok geçerli bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (78).

Sundar ve ark. Hindistanda 48 VL hastasında PCR, ELISA ve IFAT ile yaptıkları çalışmalarında PCR'ı %100 hassas olarak bulmuşlardır (50).

Cascio ve ark. VL'li şüpheli 14 hastanın 10'nunda direkt, kültür, PCR ve serolojik yöntemlerle araştırıp bunların tür düzeyinde ayırımlarını yaparak karşılaştırmışlardır (56).

Pizzutu ve ark. HIV ile enfekte şüpheli 52 hastanın 10'nuna VL tanısı koymuşlardır (128).

Yapılan çalışmalarda uygulanan tanı yöntemlerinden kültürün zahmetli ve zaman alışı, geleneksel tanı metodlarından direkt mikroskopik tanının zayıf oluşu, ELISA'nın güvenilirliğinin düşük oluşu bunun yerine son zamanlarda hızlı tanı konması ve diğer yöntemlere göre daha hassas olan PCR ile tanı konulmasını savunmuşlardır.

E.S.Silva ve ark. 85 hastadan aldıkları kan ve kemik iliği örneğinin 19'una VL tanısı koyarak ELISA ve IFAT testleri ile karşılaştırmış ve PCR'nin duyarlılık ve özgüllüğünü belirtmiş, diğer tanı testlerinin oluşturacağı çapraz reaksiyonlar ve enfeksiyonların şu an mı yoksa geçirilmiş mi olduklarının ayırımın yeterli yapamamasını vurgulamışlardır (125).

Benzer şekilde bizim çalışmamızda da serolojik testler ve direkt mikroskopi ile karşılaştırdığımızda PCR ile daha hassas sonuçlar almamıza karşın örnek alımı işleminin PCR'da da çok önemli olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda ve diğer çalışmalarda görüldüğü gibi parazitin direkt olarak görülmesi altın standart olma özelliğini hala korumaktadır. Buna karşın örnek alınımındaki hatalar yüzünden duyarlılığı düşük olabilmektedir. PCR yöntemi ile tanıda duyarlılık

artırılabilir. Serolojik yöntemler de yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermektedirler. Ancak eşik değerin altındaki olgularda da direkt bakıda parazit görülebilmekte ya da PCR ile parazit DNA'sı saptanabilmektedir. Buna karşın nadir de olsa uygun örnek alınamamasına ve örnekteki PCR inhibitörlerine bağlı olarak PCR ile yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir (14, 127).

Bu nedenlerle PCR'ın diğer yöntemlere alternatif olması yerine, diğer yöntemlerle birlikte uygulanmasının leishmaniasis tanı ve takibinde daha yararlı olacağını düşünmekte ve önermekteyiz.

Güvenirlikleri nispeten daha düşük olmasına rağmen, serolojik yöntemlerin endemik alanlarda bulunan insan ve köpeklerdeki leishmaniasis insidansını ve aralarındaki ilişkiyi belirlemek için sıklıkla kullanıldığı bildirilmiştir. Herhangi bir serolojik testin sonucunun diğer testlerle, klinik ve epidemiyolojik verilerle dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi ve yargılanması gerektiğini bir kez daha ortaya koymuştur (35).

Ertabaklar ve ark. Çorum'da yaptığı çalışmalarında IFAT ve DAT'nin yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğunu, bir hastanın önce serolojik olarak teşhis edilmesi ve sonra bunun parazitolojik olarak doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca daha önceki yıllarda bildirilmiş bir olgunun olmadığı Çorum ilinin değişik yerlerin de VL'e rastlanıldığını dolayısıyla ülkemizin birçok bölgesinde olduğu gibi bu bölgede de görev yapan birinci basamak hekimlerimize duyurulması gerektiğini ve hastalığın belirtilerinden bir veya birkaçını gösteren kişilerde mutlaka ayırıcı tanı için en azından bir serolojik testin uygulanması gerekliliğini ortaya koymuşlardır (4).

Aşağıdaki çalışmalarda da görüldüğü gibi ülkemizde farklı bölgelerde rastladığımız kala-azar hastalığı sporadik olarak görülmekte fakat yaygınlığı nedeniyle dikkat çekmektedir.

1980 yılı öncesine kadar Ege bölgesinde bildirilen olgular çoğunlukla sporadik olarak rapor edilmiştir. 1993 yılı itibarıyla başlatılan uluslararası VL ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar

bu bölge için bir başlangıç olmuştur. 1993-1995 yılları arasında Manisa'da 12 kemik iliği aspirasyon örneğinde leishmania amastigotları tanımlandı, 8 olguda kültür pozitif olarak bulundu. Bu sekiz olgu ve 2 köpek lenf nodu aspirasyon örnekleriyle ilgili yapılan moleküler çalışmalar ile bunların *Leishmania infantum* olduğu belirlendi (129). Bunun yanı sıra yapılan bir diğer çalışmada 1990-1995 yılları arasında Manisa ve çevresinde 21 VL olgusu bildirilmiştir (130). İç Anadolu bölgesinde 1968-1992 yılları arasında hiçbir olgu bildirilmemiş, 1993'de bir 1995'de sekiz olgu rapor edilmiştir (131).

VL'in 1997 yılı öncesine kadar coğrafik dağılımı ve bildirimi ile ilgili Sağlık Bakanlığı verileri yeterli ve düzenli değildir. 1997'de 71, 1998'de 34, 1999'da 22 2000'de 34 olmak üzere toplam 161 olgu bildirilmiştir. Bu olgular Akdeniz, Ege, ve İç Anadolu bölgesi olmak üzere sıralanmıştır (5). VL'le ilgili yurdumuzda özellikle kıyı bölgeler başta olmak üzere diğer bölgelerden de olgu sunumları değişik araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalarla bildirilmiştir. CL yurdumuzda özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde sıkça görülmesine karşın VL'e yurdumuzun hemen hemen bütün bölgelerinde sporadik olarak rastlanır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bildirilen VL vakaları;

Şahin ve ark Kayseri yöresinden 18 aylık bir çocuğun kemik iliği yaymasında bol amastigot formları görmüşler ve VL tanısı koymuşlardır (132).

Aksaray ve ark. 1976-1987 yılları arasında Adana, Adıyaman, Antalya, Gaziantep, İçel ve Urfa illerinden gelen toplam 16 hastanın VL olduğunu bildirmişlerdir (133).

Özerdem ve Mete Dicle Üniversitesi'nden Ocak 1991-Ocak 1992 tarihleri arasında klinik olarak VL ön tanısı konmuş 80 hastada *L. donovani* IgG antikorunu % 38.75 oranında pozitif, formol-gel deneyini de % 20 oranında pozitif bulduklarını bildirmişlerdir (134).

Ak VL şüpheli 50 hastanın serumunda IFAT ve ELISA yöntemleriyle antikor aramıştır. Altı hastada IFAT yöntemi ile pozitif sonuç alınmış aynı zamanda kemik iliği yaymalarında da leishmania amastigotları görülmüştür. ELISA yöntemi ile 22 hastada

negatif, ikisinde 1/16, 20'sinde 1/64, üçünde 1/256 ve üçünde 1/512 sulandırmalarda pozitif sonuç aldığını bildirmiştir (135).

Özbilgin ve ark. hepatosplenomegalisi, ateşi, kilo kaybı ve pansitopenisi olan 59 hastanın kemik iliğinden NNN besiyerine ekim yapmışlar ayrıca Giemsa ile boyayıp incelenmişlerdir. Serum örneklerinden de IFAT, ELISA ve DAT ile antikor araştırmışlardır. 59 hastanın 15'inde *Leishmania amastigot*larını gördüklerini bildirmişlerdir (136).

Handemir ve ark. 140 askeri personelden topladıkları serumları VL seroprevalansı için; IFAT ile *Leishmania infantum*'a. karşı oluşan IgG antikorları yönünden araştırmışlardır. Ancak serumların hiçbirinde IgG antikorlarına rastlanmamıştır (137).

Polat ve ark 2003 yılında İstanbul'dan bir VL vakası bildirmişlerdir (9).

Ertabaklar ve ark. Muğla ili Göztepe köyünde 9 yaşında bir çocuğa kala-azar tanısı konduktan sonra çocuğun ölmesi ve komşu bir köyde de başka bir çocuğun kala-azar olması nedeniyle bu köyde araştırma yapmışlardır. Çocuklarda kala-azar yönünden serolojik bir bulgu elde edilmezken, köydeki 2 köpekte *leishmania* serolojisi pozitif çıkmıştır (138).

Özbel ve ark . son 2 yılda 4 kala-azar vakası görülen Batı Karadeniz'de Safranbolu'ya bağlı Nebioğlu köyünde 55 çocukta yaptıkları çalışmada, bu çocukların 54'ünde *Leishmania* serolojisi negatif çıkarken daha önce kala-azar olan tedavi olmuş bir hastadaki ELISA, IFAT ve DAT testlerini pozitif bulmuşlardır. Bu köydeki şüpheli 5 köpekten alınan lenf aspirasyon materyalinin 2'sinde yapılan yayma preparatlarda *Leishmania*'nın amastigot formlarını görmüşler ancak NNN besiyerine ekilen lenf aspirasyon materyallerinde üreme olmadığını belirtmişlerdir (35).

Seray ve ark. insan ve köpeklerden alınan kemik iliği aspirasyon örneklerinden yaptıkları çalışmalarda PCR ile diğer tanı testlerinden direkt ve IFAT karşılaştırmalarında PCR'ın tanıdaki hassasiyetinin diğerlerine göre çok daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (12).

Polat ve ark. İstanbul'da yaptıkları Visseral Leishmaniasis şüpheli 26 hastaya uyguladıkları çeşitli tanı testleri ve PCR sonucunda 6 hastanın *Leishmania infantum* olduğunu belirlemişlerdir (11).

Yapılan çalışmalarda VL görülen bölgeler de bir epidemi veya endemi olmadığı, ülkemizin birçok bölgesinde olduğu gibi sporadik VL olgularının bu bölgelerde de görüldüğü saptanmıştır. Ancak hastalığa kaynaklık eden köpeklerin başta kırsal alanlar olmak üzere her yerde bulunması ve vektör Phlebotomus'ların bu kaynaktan alabilecekleri paraziti her zaman insanlara bulaştırma olasılığı da göz ardı edilmemelidir.

Bununla birlikte hastalığın yayılmasında etken olarak kentler arası ulaşımın kolaylaşması ile yolculukların ve göçlerin, beraberinde yetersiz altyapı ve sağlıksız konutların artması, ana kaynak olan hastaların tedavi edilememesi, tarım alanları ve sulamanın artması, kalıcı insektisid uygulamasının etkin ve yeterli yapılamaması ve vektörün insektisidlere direnç kazanması, ekolojik değişiklikler vb gibi faktörleri de sıralamak olasıdır. Ayrıca tanı koymada yaşanan güçlükler, hastada oluşan psiko-sosyal rahatsızlıklar, her sağlık kurumunda ayrıntılı tanı ve teşhis edememenin getirdiği olumsuzluklar gibi tanıda karşılaşılan sorunların da çözüme ulaştırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, VL Türkiye'de endemik ancak İstanbul ve çevresinde sporadik olarak görülmektedir. Ülkemizin değişik bölgelerinde bulunmasına rağmen tanıda akla en son gelen hastalıklar arasında yer almaktadır. Şehirlerarası ulaşımın çok arttığı günümüzde leishmaniasis'in her bölgemizde rastlanabilecek bir hastalık olduğu gözardı edilmemelidir.

6. ÖZET

Bir enfeksiyon hastalığı olan leishmaniasis çok eskilere dayanan bir geçmişi olmasına rağmen hala hastalıkla ilk karşılaşıldığında akla getirilmemesi temel tanı sorunlarından biridir. Tanıda hızlı ve güvenilir laboratuvar metotlardan biri olan PCR'nın de kullanılmasının önemi büyüktür.

Çalışmamızın amacı Visseral Leishmaniasis (VL) şüpheli hastaların kemik iliği ve kan örneklerini PCR yönünden araştırarak, uygulanan Giemsa, kültür ve diğer serolojik yöntem sonuçlarıyla karşılaştırmaktır. Ayrıca hastaların klinik dosyalarından bize gelene kadar hastalığı ile ilgili tanı ve hukuksal yönden karşılaştığı sorunların neler olduğunu belirleyerek, konunun toplumsal ve adli bilimler açısından önemini vurgulamak da amaçlanmıştır.

Ülkemizde özellikle kıyı bölgelerinde rastlanan ancak İstanbul, İçel, Adana, Ankara, Konya ve Erzurum'da da vakaların bildirildiği VL'in etkeni *Leishmania infantum*'dur. Çalışmamızda 01.04.2002 tarihinden 30.04.2006 tarihine kadar VL şüpheli 59 hasta araştırılmıştır. VL'den şüphelenilen hastaların yattıkları hastaneye gidilerek hastalardan kemik iliği ve kan örnekleri alınmıştır. Kemik iliğinden hasta başında 3 adet NNN besiyerine ekim yapılmış ve yayma preparatlar hazırlanmıştır. Kan örneklerinden Formojel, ELISA IgG ve IFAT IgG testleri yapılmıştır. Tüpdeki kemik iliği örnekleri ve kalın damla preparatları PCR çalışması için Berlin'deki Humboldt Üniversitesi Charite Hijyen ve Mikrobiyoloji Enstitüsü Moleküler Parazitoloji Bölümünde tamamlanmıştır. Çalışmamızın laboratuvar tanısında VL şüpheli klinik örnekleri alınan toplam 59 hasta değerlendirilmiştir. Bunların 19 (% 32.2) 'unda bir ya da daha fazla test pozitifliği saptanmıştır. Bu hastaların Giemsa boyası ile boyanan yayma prepatlarının mikroskopik incelemesinde 7 (% 11.8) hastanın tüm laboratuvar tanı testleri pozitif, 4 (% 6.8) hastanın Giemsa boyası ile boyanan yayma preparatların mikroskopik incelemesi ve kültür sonucu

pozitif iken tüm serolojik testleri negatif bulunmuş, yine bunların PCR sonuçları da pozitif olarak belirlenmiştir. Hastalardan 4 (% 6.8)'ünün direkt mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları ve de PCR' ı negatif olduğu halde Formol-jel, ELISA IgG (>1.1 ISR), IFAT IgG (>1/256) testleri pozitif bulunmuştur. Çalışılan kemik iliği örneklerinden NNN besiyerlerinde üretilen *Leishmania* kültürlerinden 11 (18.6)'ne PCR (PCR-ITS1, DEC, Nesdet-PCR, RFLP) yapılarak bunların *Leishmania infantum* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hastalardan 2 (% 3.4)'sinde *P. vivax* görülmüştür. 1 (% 1.7)'ine leptospira tanısı konulurken, 1 (% 1.7)'ine de pnömoni tanısı konmuştur. Hastalardan 40 (% 67.8)'ında direkt mikroskopik incelemeler, kültür, serolojik testler ve PCR sonuçları negatif bulunmuştur.

Testlerinde bir ya da daha fazla pozitiflik saptanan VL'li hastalar her ne kadar diğer bazı hastalıklarla benzer klinik tablo sergilese de, öncelikli olarak başlangıçta akla gelmeyişi temel tanı sorunu olarak görülmüştür. Bu durum hastaların yaşadıkları yerlerden çok değişik yerlere doğru tanı ve tedavi için başvurmaları, maddi ve manevi kayıplara uğramalarına ayrıca tanı ve tedavide geç kalmalarına yol açmaktadır.

Çalışmamızda PCR yönteminin VL tanısında kullanılmasının uygun olabileceği saptanmıştır. Ancak güç ve zor alınan klinik örneklerin yeterli olmaması göz önüne alınarak diğer laboratuvar tanı testleriyle birlikte uygulanmasının tanıda hassasiyeti artırabileceği ve de bunun sonucunda olası tanı kusurlarını azaltacağı göz önüne alınmalıdır. Ayrıca günümüzde artmış olan ulaşım imkanları nedeniyle VL'nin başka bölgelere taşınabileceği düşünülmeli ve şüpheli vakalarda VL'in atlanmayarak akılda tutulması gereken bir hastalık olduğu da unutulmamalıdır.

7. SUMMARY

Even though *Leishmaniasis* can be traced far back as an infectious disease, yet confronted with the symptoms, it shows to be one of the problematical for clinical diagnosis. Therefore, the value of *PCR* as an alternative laboratory method for diagnosing allows its use for the ease of processing and the short time of obtaining results.

The aim of this study is to compare the laboratory aspects related to *PCR*, using specimen of bone marrow and blood, taken from patients suspected for *Visceral Leishmaniasis (VL)*, and the results of *Giemsa*, culture, and different serological methods. Furthermore, the evaluation of appearance of problems related to clinical and legal aspects, social reflexes, and forensic issues.

The agent of this cutaneous cases occur in coastal regions of Turkey, with some reported cases in Istanbul, İçel, Adana, Konya and Erzurum, and were detected as *Leishmania infantum*. In this study, 59 patients suspected for *VL* were presented from 2002 to 2006. The bone marrow samples of each patient were applied to 3 NNN culture media, and microscopic smears were prepared, and using the blood collections, *Formo-gel*, *ELISA IgG* and *IFAT IgG* tests were done. The *PCR* testing of bone marrow samples, and the thick drop preparation were performed in *The Humboldt University Charité Hygiene and Microbiology Institute*, Department of Molecular Parasitology, Berlin. In the group of patients, 19 were confirmed positive for one or more of the diagnosing tests. According to the *Giemsa* tests, 7 were considered positive to all of the laboratory methods, while only 4 showed negative results only for serological tests. However, these 4 cases were shown again positive, using the *PCR* method. Further, *Formol-gel*, *ELISA IgG*, and *IFAT IgG* tests were positive in 4 individuals, who were negative for direct microscopic examination, culture, and *PCR*. Using *PCR*, *Leishmania* cultures in NNN of bone marrow samples 11 cases were confirmed for *Leishmania infantum*. Moreover, *P. vivax* was detected in 2

samples, 1 patient diagnosed as *leptospira*, and 1 as *pneumonia*. In 40 out of 59 cases, direct microscopic examination, culture, serological tests, and *PCR* showed negative results. It shows, that *VL* patients showing one or more positive test results, exhibit similar clinical symptoms as with some other diseases, and therefore poses main diagnostic problems. In these situations, patients are compromised, regarding to early diagnosis, as well as financially and mentally.

In conclusion, the advantages of *PCR* for diagnosing *Leishmaniasis* should be considered in the context of the diagnostic services and according to epidemiological and clinical characteristics of the disease. Although, due to the insufficient character and number of clinical samples, which were collected under difficulty, simultaneous application of *PCR* along with the other tests may improve the sensitivity, leading to less diagnostic errors. Also, it should be kept in mind, that improvements in travel opportunities might cause the transfer of *VL* and therefore acquires more knowledge about the disease, particularly in suspicious cases.

8. KAYNAKLAR

- 1- Kılıç SS . Kala-azar ve Diğer Leishmania İnfeksiyonları. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Editörler.Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul.2002 cilt 1, s 685-696
- 2 -Unat E K,Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. İstanbul 1991: 570- 9
- 3-Pearson RD, Sousa ADQ, Jeromino SMB. Leishmania species : visceral (kala-azar) , cutaneous and mucosal leishmaniasis. In:Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.editors. Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.Fifth edition.Philedelphia: Churchill Livingstone 2000 : 2831-44
- 4 - Ertabaklar H, Özkan TA, Özensoy S, Özbel Y, Babür C, Esen B, Uğurlu M. Çorum da Çocuklarda Visseral Leishmaniasis İncelenmesi.Türkiye Parazitoloji Dergisi.2003 : 27(4) :233-236.
- 5- Ok Ü Z, Balcıoğlu İ C, Özkan A T,Özensoy S, Özbel Y. Leishmaniasis in Turkey. Acta Tropica 2002 ; 84:43-8
- 6- Bodur H, Korkmaz M, Akıncı Esragül, Çolpan A, Eren S S, Erbay A . Viseral Layşmanyoz :İki Olgu Bildirisi. Klimik Dergisi.2003; 2 :95-7.
- 7- Polat E, Çakan H, Aslan M,Yakar H. Viseral Leishmaniasis Şüpheli 26 Vaka.XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi. İzmir Özet Kitabı 2005 : 168.
- 8- Özensoy S, Korkmaz M, Balcıoğlu İC, Özbel Y,Ertabaklar H, Rastgeldi S .Karaburun ve Urla Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasis.Türkiye Parazitoloji Dergisi 2002: 26(3):234-38.
- 9- Polat E, Aygün G, Aslan M, Aksın E D, Yıldırım A ,Altaş K. Bir Kala-azar Olgusu . Türkiye Parazitoloji Dergisi 2003: 27(1):4-5.
- 10-One World Health Organization : Treatment in Leishmaniasis (Erişim: www.oneworldhealth.org/diseases/leishmaniasis.php. Erişim tarihi:12.05.2006)
- 11-Polat E. Viseral Leishmaniasis tanısı. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi.Özet Kitabı 2003:105.
- 12- Özensoy S, Özbel Y, Gül M A, Ertabaklar H, Şakru N, Taylan A Ö, Hökelek M. İnsan ve Köpeklerden Alınan Klinik Örneklerle Leishmaniasis Tanısı İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulanması .Türkiye Parazitoloji Dergisi 2002:26(3):239-44.

- 13- Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamote J, Bastien P. Comparision of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood .J. Clin.Microbiol 2001;39 (2):613-17
- 14- Reithenger R, Quinnell RJ, Alexdar B, Davies CR .Rapid detection of Leishmania infantum infection in dos comparative study using an immunchoromatograpic dipstick test, Enzyme Linked Immunosorbent and PCR. J. Clin Microbiol. 2002 :40(7):2352-356
- 15-Schallig HDFH, Schone GJ, Koron CCM, Hailu A, Chappius F,Veecken .Development and application of simple diagnostic tools for visceral leishmaniasis .Med Microbiol Immunol 2001;190:69-1
- 16-Öner YA, Sahip N, Keskin C, Palandüz A. Bir Visseral Leishmaniasis Olgusu .Türkiye Parazitoloji Dergisi 2003;27(3): 176-78
- 17-Özdener N, Kayar B,Köksal F, Akbaba M. Leishmania Sempozyumu Kursu Değerlendirme ve Öneri Formuna Verilen Yanıtlar. XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet kitabı 2005;167-68.
- 18-Buyurgan V. Bulaşıcı Hastalıklar İhbarı ve Bildirim Sistemi. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Bulaşıcı Hastalıklar Dairesi 2005
- 19-Arda B. Visseral Leishmaniasis. XIII Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı 2003 :113.
- 20-Kuman H A.Leishmania Türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Editörler. Editörler.Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul.2002 cilt 2, s.1870-1878
- 21- Ak M , Özbel Y, Özensoy S, Turgay N. Visseral Leishmaniasis. İmmun yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları. Editör. Özcel M A. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları . Ege Üniversitesi Basım Evi- Bornova. İzmir ,1995,s.69-107
- 22- Desjeux, P. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.; 2004: 27(5):305-18
- 23- Lainson R, Shaw J J. Evolution, classification and geographical distribution. In Peters W & Killick-Kendrick R, editors . The Leishmaniasis in Biology and Medicine, vol. Orlando: Academic Press, 1987 . p 1-120.
- 24- Herwaldt BL. Leishmaniasis.The Lancet 1999; 354: 1191-9.
- 25- Kocabaş E, Antmen B, Alhan E, Yıldıztaş D, Aksaray N.Çocukluk çağında kala-azar. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.1998;23(2):95-101

- 26-Köktürk A, Baz K, Aslan G, Kaya İ T, Yazıcı Ç A, İkizoğlu G, Çamdeviren H. İçel’de Kutanöz Leishmaniasis’in Durumu. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2002 : 26(4):367-369
- 27-Karaman Ü, Atambay M, Ayçan M Ö, Daldal N. Leishmania infantum ve Leishmania Majör promastigotlarının tavşan, inek, koyun ve insan kanlı NNN (Novy- Nicole-Mc Neal Besiyerinde Üreme Potensiyellerinin Karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2003 : 27(4):225-227
- 28-Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001;95:239–43.
- 29- Bulle B, Millon L, Bart LM, Gallego M, Gambarelli F, Portus, M, Schnur L, Jaffe C L, Fernandez B S, Alunda J M. Piarroux R. Practical Approach for Typing Strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. J. Clin. Microbiol.; 2002 : 40 (9): 3391–3397.
- 30-Lane R P. Sandflies (Phlebotominae). In: Lane, R P and Crosskey R W (Eds) medical Insects and Arachnids. Chapman & hall, London, 1993: pp. 78-109.
- 31- Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. Clin. Dermatol. 1999 : 7 (3): 279-289
- 32- Ashford R W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin. Dermatol; 1996. 4: 523–32.
- 33- Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Review. Clinics in Dermatol 1996 ; 14: 417-423.
- 34- Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis Curr Opin Infect Dis, 2003 ; 15 : 593-598
- 35- Özbel Y, Turgay N, Alkan MA, Babaoğlu A, Özensoy S, Babalıoğlu N. Batı Karadeniz Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasis Odağı Karabük. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2002 ; 26(4):362-366
- 36- World Health Organization:Who Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases(Erişimwww.who.int/entity/csr/resources/puplications/surveillance/Leishmaniasis.pdf,Erişim tarihi: 12.05.2006)
- 37-Yaşarol Ş. Medikal Parazitoloji. E.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları. İzmir,1984,s 60-66,339-340.
- 38- Bogdan C, Röllunghoff M, Solbach W. Evasion strategies of Leishmania parasites. Parasitol Today, 1990 : 6: 183-187.
- 39- Alvar J, Gutierrez S B, Molina R, Lopez V R, Garcia C A, Martinez P, Laguna F, Cercenado E, Galmes A. Prevalence of Leishmania infection among

- AIDS patients. *Lancet*, 1992; 339: 1427.
- 40- Altes J, Salas A, Riera M, Udina M, Galmes A, Balanzat J, Ballesteros A, Buades J, Salva F, Villalonga C. Visceral leishmaniasis: another HIV-associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of the literature. *AIDS*, 1991; 5: 201-207.
 - 41- Molina R, Lopez VR, Gutierrez SB, Jimenez MI, Alvar J. Isolation of *Leishmania infantum* from the blood of a patient with AIDS using sandflies
Tans.R.Soc.Trop.Med.Hyg, 1992 ; 86 : 516
 - 42- Alvar J, Canavate C, Gutierrez SB, Jimenez M , Laguna F, Lopez VR, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection : the first 10 years . *Microbiol Rew*. 1997 ; 10:298-319.
 - 43- Sacks DL, Louis JA, Wirth DF. Leishmaniasis . In Warren KS (Edition). *Immunology and Molecular biology of parasitic infections*. Third edition, 1993 . p 237-259.
 - 44- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS . *Cellular and molecular immunology*. JW.Saunders Company. 1991, p 225-244.
 - 45- Chang K P, McGwire B S . Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease*; 2002; 1:1
 - 46- Cox, F. E. G. History of Human Parasitology, *Clinical Microbiology Reviews*, 2002; 595–612
 - 47- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infect Dis* 2002;2:494-501.
 - 48- Laguna F, Garcia SJ, Soriano V. Gastrointestinal Leishmoniasis in HIV infected patients: Report of five cases and review. *Clin Infect Dis*. 1994 ; 19:48-53.
 - 49- Budak S, Akısu Ç, Dağcı H. Diğer Tanı Materyalleri ve Uygun Tanı Yöntemleri. Özcel MA, Altıntaş N. editörler. *Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları* No :15, İzmir. 1997, 97-148
 - 50- Sundar S, Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab.Immunol*. 2002 ; 9 (5):951–958
 - 51- Reed S G. Diagnosis of Leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, 1996; 24:471-478
 - 52- Pearson D P, de Quieroz Sousa D. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. *Clin Inf Dis*. 1996, 22:1-13.
 - 53- Osman O F , Oskam, L , Zijlstra, E E, Kroon N C, Schoone, G J, Khalil E T, El-Hassan, A M , Kager P A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*; 1997 : 35(10): 2454-2457.

- 54- Aviles H, Belli A, Armijos A, Monroy F P, Harris E. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J. Parasito*; 1999; 85(2): 181-7.
- 55- Dye C, Vidor E. Dereure, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.* 1993; 110: 647-656.
- 56- Cascio A, Calattini S, Colomba C, Scalomogna C, Galazzi M, Pizzuto M, Camili R Gramiccia M, Titone L, Corbellino M, Antinori S. Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis and Prognosis of Mediterranean Visceral Leishmaniasis in Immunocompetent Children. *Pediatrics*, 2002; 109 (2); pp27
- 57- WHO-TDR 2005. Leishmaniasis .Seventeenth Programme Report Progress 2003-2004
- 58- Leandro C, Campino L. Leishmaniasis : efflux pumps chaemoresistance . *Int J Antimicrob Agents* .2003 ; 22 : 1323-1337.
- 59- Delibaş BS, Akısu Ç. Diğer Kan ve Doku Protozoon Hastalıklarının Tedavisi . Akısu Ç, Korkmaz M. ed. *Tıbbi Parazitolojide Tedavi*, Türkiye Parazitoloji Derneği 2005, Yayın No : 20 s107-110
- 60-Çetin ET, Ang Ö, Töreci K. *Tıbbi Parazitoloji*. İ.Ü.Çapa Tıp Fakültesi Yayınları. İstanbul 1995,s 99-108,434-436.
- 61- Berman J, Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 2003 ;16 : 397-401.
- 62- Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis *J Infect Chemother*, 2004; 10 : 307- 315.
- 63- Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45 : 2185 - 2197
- 64- Castagnola E, Davidson RN, Fiore P, Tasso L, Rossi G, Mangraviti S, Di Martino L, ScottiS, Cascio A, Pempinello R, Gradoni L, Giacchino R. Early efficacy of liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 : 90: 317-318.
- 65- Rosenthal E, Marty P. Recent undarstanding in treatment of visceral leishmaniasis *J Post grad Med.* 2003 ; 20 : 122-134.
- 66-Kager PA. Visceral leishmaniasis. In Gilles HM, ed.*Protozoal Diseases* 10th Ed.London, Oxford University Pres. 1999, pp 455-462.

- 67- Smith DH. African trypanosomiasis treatment .In Gilles HM, ed. Protozoal Diseases 10th Ed. London, Oxford University Press. 1999, pp 349-351.
- 68- World Health Organization: Leishmaniasis (Erişim: www.who.int/leishmaniasis/en/
Erişim tarihi : 12.05.2006)
- 69- Schallig H D , Oksam L. Review : Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. Trop. Med. Int. Health. 2002; 7(8):641-51.
- 70- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 2'nci baskı. Barış Yayınları. Fak. Kitabevi. 1995, 275-285
- 71- Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan M Z, Gul K, Gilman-Sachs A, Chang K P, Reed S G, Ozel M A. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59: 363-369.
- 72- Kaul P, Malla N, Kaur S, Mahajan RC, Ganguly NK. Evaluation of a 200-kDa amastigote-specific antigen of *L. donovani* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg , 2000 ; 94: 173- 175.
- 73- Garcia L S, Bruckner D A. Diagnostic medical parasitology. 2nd. Ed., American Society for Microbiology, 1993 . Washington, DC.
- 74- Salotra P, Raina A, Negi N S. Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in Indian kala-azar. Br J Biomed Sci. 1999 ; 56 : 263-267.
- 75- Meredith SEO, Kroon NC, Sondorp E, Seaman J, Goris MG, van Ingen CW, Oosting H, Schoone GJ, Terpstra WJ, Oskam L. Leish-KIT, a stable direct agglutination test 98 based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 1995 ; 33: 1742-1745.
- 76- Sambrook J , Russell R W. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2001; 8-22
- 77- Van Eys, G. J. J. M., G. J. Schoone, N. C. M. Kroon, and S. B. Ebeling. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 1992; 51 :133–142.
- 78- Schonian G , Nasereddin A , Dinse N , Schweynoch C , Schallig H D, Presber W, Jaffe C L. Diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported Clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 47(1):349-58.

- 79- Yılmaz AY. Mikrobiyolojide Kullanılan Moleküler Tanı Yöntemleri. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi Konya Özet Kitabı 2003: s 80-83
- 80- Saiki R K, Gelfand, D H , Stoffel S , Scharf S J , Higuchi R, Hom G T , Mullis K B. Erlich H A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239 : 487-491.
- 81- Alkan Z, Özbel Y,Özensoy S. Moleküler Biyolojik Yöntemler. Özcel MA Altıntaş N.editörler.Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No 15. İzmir. 1997, 97-148
- 82- Fissore C, Delaunay P, Ferrua B Rosenthal E, GiudiceDP, Aufeuvre PJ, Fichoux LY, Marty P.Convenience of Serum for Visceral Leishmaniasis Diagnosis by PCR. J Clin Microbiol. 2004 ; 42(11): 5332–5333
- 83- Weiss J B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev . 1995; 8:113-130.
- 84- Piarroux R, Trouve V, Pratlong F, Martini A, Lambert M, Rioux J A. The use of isoelectric focusing on polyacrylamide gel for the enzymatic analysis of Old World Leishmania species. Trans R Soc Trop Med Hyg . 1994 ; 88: 475-478.
- 85- Wilson SM . Application of nucleic asid-based technologies to the diagnosis and detiction of disease . Trans Royal Soc Trop Med Hyg.1993 ; 87 : 609-611.
- 86- Werchick J. Legal implications of iatrogenic disease .In : Preger L,ed, Iatrogenic Disease Vol 2,CRC Pres, Inc,Florida, 1986 , pp 232-246.
- 87- Kayabeyoğlu İ. Tıbbi Uygulama Hataları ve Adli Tıp Açısından İncelenmesi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim dalı, Doktora Tezi, İstanbul 2000.
- 88- Albek E, Soysal Z, Eke M . İatrojenik Hastalıklarla İlgili Adli Tıp Sorunları. Adli Tıp Cilt I. Ed. Soysal Z, Çakalır C. İ. Ü. Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul, 1999: 45-59.
- 89- Koç S, Yorulmaz C. Hekimin Yasal Sorumlulukları. Adli Tıp Cilt 1. Ed. Soysal Z, Çakalır C. İ. Ü. Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul, 1999: 45-59.
- 90- Çankaya H. Hekimlerin Hukuki ve Cezai Sorumluluğunun Temel Prensipleri ve Hekim Sorumluluğunda Kusurun Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Adli Tıp Kurumu, İstanbul, 1992
- 91- Soyer A, Balta E. Hekimlik,Tıbbi Etik ve İnsan Hakları-Uluslar arası ve Ulusal Belgeler Türk Tabipleri Birliği Yayınları Ankara,1996

- 92- Graskemper JP. The standard of care in dentistry: Where did it come from? How has it evolved?, Journal of American Dental Association, 2004 : 135(10):1449-55,
- 93- Snook I, Donald Jr. Hospitals.What They Are and How They Work, Apsen Publication, Philedelphia, 1981.
- 94- Alton Jr, Walter G. Malpractise A Trial Lawyer's Advice for Phsicians (How the Avoid How to Win), Little Brown and Company , Boston, 1977.
- 95- Dünya Tabipleri Birliği'nin Tıpta Yanlış Uygulama Konulu Duyurusu (Malpractice) (Türk Tabipleri Birliği, 1998;43), (44. Dünya Tabipler Birliği Genel Kurulu'nda Kabul Edilmiştir, 1992.
- 96- DeVore DT. Legal considerations for treatment following trauma to teeth. Dental Clinic North America, 1995 ; 39(1) : 203-19.
- 97- Prosser W. Handbook of the law of torts. St. Paul, Minnesota, West Publishing, 1971;164.
- 98- Jerrold L. Litigation, legislation, and ethics. Determining a national standard of care, American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2004 ; 25(2) : 223-5.
- 99- Hyder, A.A, Dawson L. Defining Standard Of Care In The Developing World: The Intersection Of International Research Ethics And Health Systems Analysis, Developing World Bioethics, 2005; 5 (2) : 142-152.
- 100- Yargıtay 13. Hukuk Dairesi, 14.03.1983, E: 1982/7237, K:1983/1783, sayılı kararı
- 101- Yargıtay 13. Hukuk Dairesi, 06.11.2000,E:2000/8590, K:2000/9569, sayılı kararı
- 102- Yargıtay 13. Hukuk Dairesi, 06.03.2003, E:2002/13959, K:2003/2380, sayılı kararı
- 103- Yargıtay 13. Hukuk Dairesi, 06.11.2000, E:2000/8590, K:2000/9569, sayılı kararı
- 104- Yargıtay 4. Hukuk Dairesi, 04.03.1994, E:1993/8557, K:1994/2138, sayılı kararı
- 105- Yargıtay 13. Hukuk Dairesi, 25.04.2002, E:2002/2589, K: 2002/4560, sayılı kararı
- 106- Yargıtay 13. Hukuk Dairesi, 09.05.2000, E: 2000/1146, K: 2000/4438, sayılı kararı
- 107- Yargıtay 13. Hukuk Dairesi, 21.01.2002, E:2001/10959, K:2002/487, sayılı kararı
- 108- Hasta Hakları Yönetmeliği, Madde 11
- 109- Short D. Learnig from our Mistakes, British Journal of hospital Medicine, 1994 ; Vol 51, No 5 , 250.
- 110- Roberts DK. İnformed Consent and Medicolegal Problems, In: Sciarra JW, ed.Gynecology and Obstetrics,Harper and Row Publishers , Philedelphia, 1985, pp1-10
- 111-Rakich J S, Longest JR, Beaufort B, Darr K. Managing Health Services Organizations, Third Edition, Health Profession Press, Baltimore, 1993.
- 112- Polat O .Tıbbi Uygulama Hataları : Klinik-Sosyal – Hukuksal-Etik Boyutlar. I.Baskı

- Seçkin yayıncılık. Ankara, 2005.
- 113- Hancı İ H. Malpraktis : Tıbbi girişimler Nedeniyle Hekimin Ceza ve Tazminat Sorumluluğu. I.Baskı . Seçkin yayıncılık . Ankara, 2002 .
- 114- Mandell MS. Medicolegal Problems and Responsibilities. In : Nichols DH, Evrard JR. ed. Ambulatory gynecology. Harper and Row Publishers, Philadelphia, 1985: 497-499.
- 115-Hamit İ H, Özdemir M H. Hekim Hataları ve Yüksek Sağlık Şurası. III. Adli Bilimler Kongresi Bildiri Özet Kitabı.1998
- 116- Neale B G. Reducing Risks in Medical Malpractice, Addenbrooke's and NHS Trust, Cambridge, England, 1993. 255.
- 117-Keskin T R . Sağlık Personelinin Obstetrik ve Jinekoloji Uygulamalarındaki Hatalarının Adli Tıp Açısından Değerlendirilmesi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 1996.
- 118- Yorulmaz Ç, Kır Z, Ketenci H. Tıbbi Uygulama Hataları ve Bilirkişilik. ed. Çetin G,Yorulmaz Ç. Yeni Yasalar Çerçevesinde Hekimlerin Hukuki ve Cezai Sorumluluğu Tıbbi Malpraktis ve Adli Raporların Düzenlenmesi. İ.Ü.Cerrahpaşa Sürekli Tıp Eğitimleri Sempozyum Dizisi, 2006, s 55-69
- 119- Özdemir MH, Salaçin S, Ergöner TA. Hatalı tıbbi girişimlerde karşılaşılan bilirkişilik Sorunları, IV Adli Bilimler Kongresi, İstanbul, Özet Kitabı 2003: 10-13
- 120- Gündoğmuş ÜN, Ersoy N, Biçer Ü.Yüksek Sağlık Şurası Kararlarının Etik Açidan Değerlendirilmesi. Toplum ve Hekim, 1998; 13, 8-14.
- 121- Liang BA. Who Can Be an Expert in Anesthesia Malpractice Suit? A Case of General Anesthesia,Cardiopulmonary Risk, and Patient Death. Journal of Clinical Anesthesia 2003; 15:395:397
- 122- Aşcıoğlu, C.Tıbbi Yardım ve El Atmalardan Doğan Sorumluluklar, Ankara, 1993.
- 123- Harms G,Schönian G,Feldmeier H. Leishmaniasis in Germany. Emerg Infect Dis, 2003, 9 (7): 03-023.
- 124- Canpolat N, Ayaz AN, Kıyak A,Gönül A,Turhan P.Deri Bulguları ile seyreden bir Visceral Leishmaniasis olgusu. SSK Tepecik Hast Derg 2004;14(2):125-128
- 125- Silva SE, Gontijo FMC, Pacheco SR, Brazil PR. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. Gen Mol Res 2004; 3(2): 251-257.
- 126- Piarroux R, Gamberelli F,Dunon H, Fontes M, Mary C, Toga B, Quilici M.Comparasion of PCR with direct examination of bone marrow aspiration,

- myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immuno compromised patients. *J Clin Microbiol*, 1999; 32(3):746-749.
- 127- Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp.in Diagnostic samples from human and dogs. *J Clin Microbiol*,1995 ;33(5):1145-1149.
- 128- Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, Persico T, Adriani B, Magni C, Guaraldi G, Giera G, Ludovisi M, Gramiccia M, Gali M, Moroni M Corbellino M, Antinori S.Role of PCR Diagnosis and Prognosis of Visceral Leishmaniasis in Patients Coinfected with Human Immuno deficiency Virus Type 1. *J Clin Microbiol*. 2001 ; 39 (1):357-361
- 129- Özbilgin Y, Turgay N, Özensoy S, Özbilgin A, Alkan MZ, Özcel MA, Jaffe CL, Oksam L, Abranches P.Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean Region. *Ann Trop Med Parasitol*, 1995 ; 89 (1) 89-93.
- 130- Balcioğlu IC, Özensoy S, Yereli K,Turgay N, Değerli K, Özbilgin A,Özbilgin Y.Kala-azar cases and *Phlebotomus* species inside Manisa and its interland region between the years1990-1995 .*T Parazitol Derg*.1996;20:367:373
- 131- Aydoğdu I, Dinçer SL. Visceral Leishmaniasis in children in Turkey. *Trop Georg Med* 1995; 47: 231.
- 132- Şahin İ, Aydın N, Akşehirli G, Şimşek N. Bir Kala-azar olgusu ve Kayseri yöresinde leishmaniasis problemi. *T Parazitol Derg*, 1992; 16(l):24-30.
- 133- Aksaray N, Kümi M, Kılınç Y, Tanyeli A. Çocukluk çağında Kala-azar olgularımızın incelenmesi. *T Parazitol Derg*, 1989 ; 13(l):1-6.
- 134- Özerdem N, Mete Ö. Kala-Azar (visceral leishmaniasis) enfeksiyonunda tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi. *T Parazitol Derg* 1993; 17(2): 1-6.
- 135- Ak M . Kala-Azar tanısında değişik antijenlerle serolojik araştırmalar. *T Parazitol Derg* 1989 13(3-4): 39-42.
- 136- Özbilgin A, Özdemir E, Balcioğlu İC, Girginkardeşler N, Değerli K, Ok ÜZ, Alkan MZ, Özbilgin Y. Pathological changes detected in bone marrow samples in patients with visceral leishmaniasis. *T Parazitol Derg* , 1997; 21(3): 213-215.
- 137- Handemir E, Kaya N, Şenlik B, Kamburgil K. Askeri personelde visseral

- leishmaniasis seroprevalansı. T Parazitol Derg , 2002; 26(1):31-33.
- 138- Ertabaklar H, Özensoy Töz S, Şakru N, Keleş E, Özbel Y. Muğla İli Göktepe Köyünde Çocuklarda ve Köpeklerde Visseral Leishmaniasis'in Araştırılması. T Parazitol Derg, 2001; 25(2): 128-131.

9. EKLER

Ek 1

Hasta İzlem Formu

Adı Soyadı :

Protokol No :

Hastane :

Alınan materyal (kemik iliği, kan, dalak ve karaciğer ponksiyon sıvısı) :

Cinsiyet :

Yaşı :

Tanı yaşı :

Klinik öykü :

Memleketi :

Oturduğu yer :

İlk sağlık kuruluşu başvuru :

Hastalığın başladığı tarih :

Örneğin alındığı tarih :

Tanı konulan tarih ve bildirimi yapan görevli :

Sevk edilme tanısı :

Seyahat öyküsü :

Diğer hastalıklar :

Aktif dönemde var olan klinik bulgular :

Ateş :

Döküntü :

Hepatomegali :

Splenomegali :

Diğer önemli belirtiler :

Transfüzyon :

Kan Biyokimyası : Hb: g/dl , Htc: % lokosit : ml/dl , trombosit :

Kullandığı ilaçlar :

Tedavi :

Tedavi sonrası kontrol tarihi :

Laboratuar tanı testleri

Direkt inceleme : () Elisa IgG : () IFAT IgG : ()

Kültür (NNN) : () PCR : () Formol-jel : ()

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hüseyin Çakan

Doğum Tarihi : 15.01.1965

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Evli , 2 Çocuk

Bildiği yabancı dil: Orta derecede İngilizce

Öğrenim Durumu :

Hacı Ethem Üktem İlkokulu (1971- 1976)

Kağıthane Ortaokulu (1976-1979)

Çağlayan Lisesi (1979-1982)

E.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bölümü Lisans (1984-1988)

İ .Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans (1993-1996)

İ. Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Doktora (1997-)

Mesleki Deneyimi :

1989-1990 İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kan Merkezi , Biyolog

1990-2001 İ.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Kan Merkezi Mikrobiyoloji
Laboratuvar Sorumlusu

1990-1994 İ.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü Vakfına bağlı Florence Nightingale Hastanesi
Mikrobiyoloji ve Kan Merkezi Şef Yardımcısı (Ek Görev)

2001- İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Birimi
Laboratuvar Sorumlusu Uzman Mikrobiyolog

2003 Humboldt Üniversitesi Berlin - Charite Mikrobiyoloji ve Parazitoloji
Departmanında Moleküler Çalışma

Üye Olduğu Dernekler :

Türkiye Parazitoloji Derneği

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği

Adli Bilimler Derneği

Biyologlar Derneği